



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE**



**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO, ANTIOXIDANTE E ANTIPARASITÁRIO
DE ÓLEOS ESSENCIAIS E MICROEMULSÕES DE
Duguetia stelechantha (Annonaceae) e *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae)**

AUXILIADORA CRISTINA CORRÊA BARATA LOPES

**São Luís – MA
2024**

AUXILIADORA CRISTINA CORRÊA BARATA LOPES

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO, ANTIOXIDANTE E ANTIPARASITÁRIO
DE ÓLEOS ESSENCIAIS E MICROEMULSÕES DE
Duguetia stelechantha (Annonaceae) e *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae)**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Cláudia Quintino da Rocha.

**São Luís - MA
2024**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Lopes, Auxiliadora Cristina Correa Barata.

Avaliação da Composição Química e do Potencial Antimicrobiano, Antioxidante e Antiparasitário de Óleos Essenciais e Microemulsões de *Duguetia Stelechantha* annonaceae e *Pectis Brevipedunculata* asteraceae / Auxiliadora Cristina Correa Barata Lopes. – 2024.

234 f.

Orientador(a): Cláudia Quintino da Rocha.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Rede – Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2024.

1. Formulação. 2. Leishmania. 3. Microemulsão. 4. Microrganismos. 5. Óleo Essencial. I. Rocha, Cláudia Quintino da. II. Título.

AUXILIADORA CRISTINA CORRÊA BARATA LOPES

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO, ANTIOXIDANTE E ANTIPARASITÁRIO
DE ÓLEOS ESSENCIAIS E MICROEMULSÕES DE
Duguetia stelechantha (Annonaceae) e *Pectis
brevipedunculata* (Asteraceae)**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de
Doutorado do Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biotecnologia - Rede
BIONORTE, na Universidade Federal do
Maranhão, como requisito para a obtenção do
Título de Doutor em Biodiversidade e
Biotecnologia.

Orientador(a): Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Quintino da
Rocha.

Aprovada em: 14/ Junho/ 2024

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
 **CLAUDIA QUINTINO DA ROCHA**
Data: 15/08/2024 19:48:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Quintino da Rocha (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Documento assinado digitalmente
 **EDUARDO BEZERRA DE ALMEIDA JUNIOR**
Data: 15/08/2024 20:17:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Eduardo Bezerra de Almeida Júnior
Universidade Federal do Maranhão

Documento assinado digitalmente
 **EMMANOEL VILACA COSTA**
Data: 16/08/2024 13:57:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Emmanoel Vilaça Costa
Universidade Federal do Amazonas

Documento assinado digitalmente
 **JOSE GUILHERME SOARES MAIA**
Data: 18/08/2024 12:55:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

José Guilherme Soares Maia
Universidade Federal do Pará

Rachel Melo Ribeiro
Universidade Federal do Maranhão

Documento assinado digitalmente
 **RACHEL MELO RIBEIRO**
Data: 16/08/2024 13:37:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, AUXILIADORA CRISTINA CORRÊA BARATA LOPES, (X) autorizo () não autorizo a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada “AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO, ANTIOXIDANTE E ANTIPARASITÁRIO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E MICROEMULSÕES DE *Duquetia stelechantha* (Annonaceae) e *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae)” no Portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório de Teses da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora.

São Luís, 14 de Junho de 2024

Documento assinado digitalmente
 AUXILIADORA CRISTINA CORREA BARATA LOPE
Data: 18/08/2024 18:08:13-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes

CPF: 040.003.613-41

RG: 028980732005-0

AGRADECIMENTOS

Infinitos agradecimentos a Deus, por me conceder viver mais esta etapa de minha vida e me dar força e ânimo sempre que foi preciso durante o percurso.

Ao meu filho, Thomás Barata Lopes, por ser o meu combustível, o motivo de eu querer fazer sempre o melhor. Você tornou esse processo muito mais especial. Obrigada, meu filho.

Aos meus pais, Sebastião Santos Barata e Maria do Socorro Corrêa Barata, por me incentivarem a ir sempre mais longe, por serem os meus exemplos, a minha base, o meu apoio.

Ao meu marido, Roberto Lopes, por todo companheirismo e suporte, por estender a mão todas as vezes que precisei e estar ao meu lado em cada conquista alcançada.

À minha irmã, Amélia Cristina Corrêa Barata, e toda família, obrigada por sempre acreditarem no meu potencial e festejarem comigo cada etapa cumprida.

À minha orientadora, Professora Dr^a Cláudia Quintino da Rocha, por todo ensinamento compartilhado, por tanta dedicação e pela doação incansável à pesquisa, à ciência e à docência.

Aos meus companheiros de Laboratório, em especial às pessoas queridas, que tornaram-se amigos, dividiram comigo momentos importantes desta caminhada e contribuíram para a realização deste trabalho: Aldilene Lima, Marcos Câmara, Carla Janaína, Amanda Miranda, Jessyane Nascimento, Samuel Soares, Caroline Jesus e Amanda Teles.

Aos parceiros do Laboratório de Química dos Produtos Naturais; Laboratório de Microbiologia do Controle de Qualidade de Alimentos e Água; Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais; Laboratório de Patologia e Imunoparasitologia; Laboratório de Eletroquímica; Central Analítica do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia e Núcleo de Combustíveis, Catálise e Ambiental da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Campus São Luís-Bacanga; Laboratório de Dermofarmácia da Universidade Federal Do Piauí; e Laboratório de Análise e Desenvolvimento de Produtos Naturais e Sintéticos da Universidade Estadual de Maringá.

À Universidade Federal do Maranhão e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Capes (Finance coe 001), pela estrutura concedida e pelo financiamento para realizar a pesquisa.

E ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE e todo o corpo docente, pela possibilidade de realizar o Doutorado e pela contribuição em minha formação acadêmica.

A todos, gratidão!

LOPES, Auxiliadora Cristina Corrêa Barata. **Avaliação da composição química e do potencial antimicrobiano, antioxidante e antiparasitário de óleos essenciais e microemulsões de *Duguetia stelechantha* (Annonaceae) e *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae).** 2024. 170f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, 2024.

RESUMO

Duguetia stelechantha, pertencente a família Annonaceae, é popularmente conhecida como ata brava. A espécie é pouco explorada química e biologicamente, sendo que a composição dos seus voláteis está sendo descrita pela primeira vez neste trabalho. Espécies de *Duguetias* já apresentam identificados metabólitos como alcalóides, terpenos e flavonóides, que têm demonstrado resultados promissores nas atividades biológicas de *Duguetias*. Outra importante espécie aqui investigada é *Pectis brevipedunculata*, chamada de alecrim do campo, pertencente a Família Asteraceae. As folhas da espécie contêm entre os compostos majoritários o citral, um marcador químico dos óleos essenciais (OEs) de espécies de *Pectis*, que tem efeito antimicrobiano, nematicida e larvicida. Ambas as espécies são amplamente distribuídas pelo território brasileiro, no entanto, não são aproveitadas significativamente. Da árvore de *D. stelechantha* são utilizados os frutos para o consumo direto, e *P. brevipedunculata* é consumida na forma de chá. O objetivo do trabalho foi obter OEs das folhas e cascas de *D. stelechantha* (OE-DU) e das partes aéreas de *P. brevipedunculata* (OE-PB), desenvolver microemulsões (MEs) (ME-DU e ME-PB) para incorporação dos OEs e avaliar o potencial biotecnológico das espécies. A caracterização química por GC/MS do OE hidrodestilado indicou como majoritários do OE-DU, o β -pineno (46,17%), α -pineno (20,2%) e espatulenol (6,68%) enquanto a análise de OE-PB, por GC/MS-Headspace, apontou α -pineno (56,47%), limoneno (19,98%), neral (3,78%) e geranial (3,46%). A análise das MEs por GC/MS-Headspace e infravermelho confirmou a incorporação dos OEs nas formulações. A caracterização físico-química indicou que o tamanho das partículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta estão em conformidade com a literatura. Em relação ao potencial antimicrobiano, ME-DU apresentou halos de inibição maiores para todas as bactérias testadas (*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella* spp. (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 35152), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 14579) e *Clostridium* spp.), quando comparada ao OE-DU e halos de inibição maiores ou semelhantes quando comparada aos antibióticos penicilina e gentamicina. ME-PB, apresentou halos de inibição acima de 50,00 mm para todas as bactérias pesquisadas. ME-DU e ME-PB indicaram valores de Concentração Inibitória Mínima inferiores aos obtidos pela ação dos OEs e foram consideradas com forte inibição frente a todas as bactérias testadas. ME-DU e ME-PB apresentaram concentrações de antioxidantes mais elevadas que os OEs por DPPH e ABTS. Sobre o ensaio com *Leishmania* (L.) *amazonensis*, OE-DU (CI₅₀=138,30 μ g/mL) foi classificado como moderadamente ativo; ME-DU (CI₅₀=4,47 μ g/mL), OE-PB (CI₅₀=20,00 μ g/mL) e ME-PB (CI₅₀=0,93 μ g/mL) como amostras ativas. Após teste da citotoxicidade em células RAW 264.7, o índice de seletividade resultou que ME-DU (CC₅₀=8,87 μ g/mL) e ME-PB (CC₅₀=1,33 μ g/mL) são mais seletivos para inibição do parasito e menos tóxico para as células. A contagem total de aeróbios mesófilos mostrou que ME-DU, OE-PB e ME-PB inibiram a proliferação dos microrganismos. Verificou-se que OE-DU foi mais eficiente que ME-DU para combater fungos. Enquanto, OE-PB e ME-PB foram igualmente eficientes contra os fungos, estendendo a vida de prateleira dos morangos. Os

resultados mostram o potencial dessas espécies e a incorporação dos OEs em MEs otimizou a biodisponibilidade dos princípios bioativos, melhorando as atividades biológicas.

Palavras-chave: Formulação; Leishmania; Microemulsão; Microrganismos; Óleo essencial.

LOPES, Assistant Cristina Corrêa Barata. **Evaluation of the chemical composition and antimicrobial, antioxidant and antiparasitic potential of essential oils and microemulsions of *Duguetia stelechantha* (Annonaceae) and *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae).** 2024. 170f. Thesis (Doctorate in Biodiversity and Biotechnology) - Federal University of Maranhão, Maranhão, 2024.

ABSTRACT

Duguetia stelechantha, belonging to the Annonaceae family, is popularly known as ata brava. The species is little explored chemically and biologically, and the composition of its volatiles is being described for the first time in this work. Species of *Duguetias* already have identified metabolites such as alkaloids, terpenes and flavonoids, which have demonstrated promising results in the biological activities of *Duguetias*. Another important species investigated here is *Pectis brevipedunculata*, called field rosemary, belonging to the Asteraceae Family. The leaves of the species contain citral among the main compounds, a chemical marker of the essential oils (OEs) of *Pectis* species, which has antimicrobial, nematocidal and larvicidal effects. Both species are widely distributed throughout Brazilian territory, however, they are not significantly used. The fruits of the *D. stelechantha* tree are used for direct consumption, and *P. brevipedunculata* is consumed in the form of tea. The objective of the work was to obtain OEs from the leaves and bark of *D. stelechantha* (OE-DU) and the aerial parts of *P. brevipedunculata* (OE-PB), develop microemulsions (MEs) (ME-DU and ME-PB) for incorporation of OEs and evaluate the biotechnological potential of the species. The chemical characterization by GC/MS of the hydrodistilled OE indicated that the majority of the OE-DU were β -pinene (46.17%), α -pinene (20.2%) and spathulenol (6.68%) while the analysis of OE-PB, by GC/MS-Headspace, indicated α -pinene (56.47%), limonene (19.98%), neral (3.78%) and geranial (3.46%). Analysis of MEs by GC/MS-Headspace and infrared confirmed the incorporation of OEs in the formulations. The physicochemical characterization indicated that the particle size, polydispersity index and zeta potential are in accordance with the literature. Regarding antimicrobial potential, ME-DU showed larger inhibition halos for all bacteria tested (*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella* spp. (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 35152), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 14579) and *Clostridium* spp.), when compared to OE-DU and larger or similar inhibition halos when compared to the antibiotics penicillin and gentamicin. ME-PB showed inhibition halos above 50.00 mm for all bacteria studied. ME-DU and ME-PB indicated Minimum Inhibitory Concentration values lower than those obtained by the action of OEs and were considered to have strong inhibition against all bacteria tested. ME-DU and ME-PB showed higher antioxidant concentrations than the OEs by DPPH and ABTS. Regarding the test with *Leishmania* (L.) *amazonensis*, OE-DU (IC_{50} =138.30 μ g/mL) was classified as moderately active; ME-DU (IC_{50} =4.47 μ g/mL), OE-PB (IC_{50} =20.00 μ g/mL) and ME-PB (IC_{50} =0.93 μ g/mL) as active samples. After cytotoxicity testing on RAW 264.7 cells, the selectivity index resulted in ME-DU (CC_{50} =8.87 μ g/mL) and ME-PB (CC_{50} =1.33 μ g/mL) being more selective for inhibiting the parasite and less toxic to cells. The total count of mesophilic aerobes showed that ME-DU, OE-PB and ME-PB inhibited the proliferation of microorganisms. It was found that OE-DU was more efficient than ME-DU to combat fungi. While, OE-PB and ME-PB were equally efficient against fungi, extending the shelf life of strawberries. The results show the potential of these species and the incorporation of OEs in MEs optimized the bioavailability of bioactive principles, improving biological activities.

Keywords: Formulation; Leishmania; Microemulsion; Microorganisms; Essential oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore, folha, flor e frutos de <i>Duguetia stelechantha</i> .	24
Figura 2 - Partes aéreas de <i>Pectis brevipedunculata</i> .	26
Figura 3 – Ciclo de vida do protozoário <i>Leishmania</i> .	30
Figura 4 - Redução da resazurina em resofurina na presença de células viáveis.	42
Figura 5 - Estabilização do radical livre ABTS.	44
Figura 6 - Estabilização do radical livre DPPH.	44
Figura 7 - Reação química da conversão do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil tetrazólio.	46
Figura 8 - Cromatograma GC-MS do óleo essencial extraído das folhas de <i>Duguetia stelechantha</i> (OE-DU).	50
Figura 9 - Estruturas químicas dos compostos identificados no óleo essencial (OE-DU) extraído das folhas de <i>Duguetia stelechantha</i> .	51
Figura 10 - Cromatograma GC-MS do óleo essencial extraído das cascas (OE-DU-CAS) de <i>Duguetia stelechantha</i> .	54
Figura 11 - Estruturas químicas dos compostos do óleo essencial extraído das cascas (OE-DU-CAS) de <i>Duguetia stelechantha</i> .	55
Figura 12 - Cromatograma GC/MS-headspace da microemulsão (ME-DU) do óleo essencial obtido das folhas de <i>Duguetia stelechantha</i> .	57
Figura 13 - Estruturas químicas dos compostos da microemulsão obtida do óleo essencial de <i>Duguetia stelechantha</i> (ME-DU) pelo método GC/MS-headspace.	58
Figura 14 - Espectros obtidos na região do Infravermelho para o óleo essencial (OE-DU) e a microemulsão (ME-DU) de <i>Duguetia stelechantha</i> , e seu branco (ME-BRANCO).	60
Figura 15 - Espectro obtidos na região do Infravermelho para o óleo essencial (OE-DU) e a microemulsão (ME-DU) de <i>Duguetia stelechantha</i> , e seu branco (ME-BRANCO) antes e após o teste de estabilidade térmica da microemulsão.	61
Figura 16 - Cromatograma GC-MS do óleo essencial extraído de <i>Pectis brevipedunculata</i> (OE-PB).	62
Figura 17 - Estruturas químicas dos compostos do óleo essencial (OE-PB) extraído de <i>Pectis brevipedunculata</i> empregando o método GC/MS-headspace.	63

Figura 18 - Cromatograma GC-MS da microemulsão (ME-PB) do óleo essencial (OE-PB) extraído das partes aéreas de <i>Pectis brevipedunculata</i> .	64
Figura 19 - Estruturas químicas dos compostos da microemulsão (ME-PB) formulada com óleo essencial (OE-PB) de <i>Pectis brevipedunculata</i> empregando o método GC/MS-headspace.	65
Figura 20 - Espectros obtidos na região do Infravermelho para o óleo essencial (OE-PB) e da microemulsão (ME-PB) de <i>Pectis brevipedunculata</i> , e seu branco (ME-BRANCO).	69
Figura 21 - Espectros do óleo essencial (OE-PB) e da microemulsão (ME-PB) de <i>Pectis brevipedunculata</i> , e seu branco (ME-BRANCO) antes e após o teste de estabilidade térmica da microemulsão.	70
Figura 22 - Diagrama de fases com a classificação de Winsor (1948): WI (Winsor I, sistema bifásico formado por uma fase oleosa em equilíbrio com uma fase emulsionada); WII (Winsor II, sistema bifásico formado por uma fase aquosa em equilíbrio com uma fase emulsionada); WIII (Winsor III, sistema trifásico formado por uma fase aquosa e uma fase oleosa, intermediada por uma fase emulsionada); WIV (Winsor IV, sistema monofásico, a região da microemulsão); EBL (Emulsão líquida branco leitosa); ST (Sistema turvo).	72
Figura 23 - Representação da classificação de Winsor (1948). A (Winsor I, sistema bifásico formado por uma fase oleosa em equilíbrio com uma fase emulsionada); B (Winsor II, sistema bifásico formado por uma fase aquosa em equilíbrio com uma fase emulsionada); C (Winsor III, sistema trifásico formado por uma fase aquosa e uma fase oleosa, intermediada por uma fase emulsionada); D (Winsor IV, sistema monofásico, região de microemulsão); E (emulsão líquida branca leitosa); F (sistema turvo).	72
Figura 24 - Microemulsão com óleo essencial das folhas de <i>Duguetia stelechantha</i> incorporado (ME-DU).	73
Figura 25 - Microemulsão com óleo essencial de <i>Pectis brevipedunculata</i> incorporado (ME-PB).	75
Figura 26 – Reogramas com a relação entre a taxa e a tensão de cisalhamento da microemulsão do óleo essencial de <i>Duguetia stelechantha</i> (ME-DU) e do branco da microemulsão (ME-BRANCO).	77

Figura 27 – Reogramas com a relação entre a taxa e a tensão de cisalhamento da microemulsão do óleo essencial de <i>Pectis brevipedunculata</i> (ME-PB) e do branco da microemulsão (ME-BRANCO).	79
Figura 28 - Curva de calibração do antioxidante padrão trolox por DPPH.	88
Figura 29 - Curva de calibração do antioxidante padrão trolox por ABTS.	90
Figura 30 - Viabilidade de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratados por 48 horas com o óleo essencial extraído de <i>Duguetia stelechantha</i> (OE-DU), com a microemulsão preparada com este óleo (ME-DU) e com o branco da microemulsão (ME-BRANCO).	93
Figura 31 - Viabilidade de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratados por 48 horas com o padrão α -pineno.	94
Figura 32 - Viabilidade de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratados por 48 horas com óleo essencial extraído de <i>Pectis brevipedunculata</i> (OE-PB) e sua microemulsão (ME-PB) comparada ao branco da microemulsão (ME-BRANCO).	95
Figura 33 - Atividade citotóxica do óleo essencial (OE-DU) extraído de <i>Duguetia stelechantha</i> , da microemulsão preparada com esse óleo (ME-DU) e do branco da microemulsão (ME-BRANCO) contra macrófagos RAW 264.7.	97
Figura 34 - Atividade citotóxica do óleo essencial (OE-PB) extraído de <i>Pectis brevipedunculata</i> , da microemulsão preparada com esse óleo (ME-PB) e do branco da microemulsão (ME-BRANCO) contra macrófagos RAW 264.7.	100
Figura 35 - Grupo de morangos no dia do procedimento da sanitização com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm (A) e após 15 dias (B), evidenciando a decadência visual (C) e infecção fúngica aparente (D).	105
Figura 36 - Grupo de morangos no dia do procedimento (A), com 3 (B), 7 (C), 10 (D) e 15 (E) dias após aplicação do óleo essencial (OE-DU) de <i>Duguetia stelechantha</i> .	107
Figura 37 - Grupo de morangos no dia do procedimento (A) e com 3 dias (B) após aplicação por <i>spray</i> do óleo essencial de <i>Duguetia stelechantha</i> .	109
Figura 38 - Gráfico da Contagem Total de Aeróbios Mesófilos em placas com morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos submetidos à aplicação do OE-DU, ME-DU e ME-BRANCO, em todos os tempos de avaliação.	111
Figura 39 - Gráfico da proliferação de fungos em morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos submetidos à aplicação do OE-DU, ME-DU e ME-BRANCO, em todos os tempos de avaliação.	113

Figura 40 - Avaliação da proliferação de fungos provenientes dos morangos da aplicação do OE-DU, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm e morangos não sanitizados, no tempo zero (A), com 3 (B), 7 (C), 10 (D) e 15 (E) dias após o procedimento.	114
Figura 41 - Características macroscópicas (verso e anverso) das colônias com 7 dias de crescimento em meio SDA (Ágar <i>Sabouraud</i> dextrose) acidificado, a 25±3°C e fotografia de microscopia óptica 40x com características microscópicas dos gêneros de fungos filamentosos identificados.	120
Figura 42 - Grupo de morangos no dia do procedimento da sanitização com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm (A) e após 15 dias (B), evidenciando a decadência visual (C) e infecção fúngica aparente (D).	126
Figura 43 - Grupo de morangos no dia do procedimento (A), com 3 (B), 7 (C), 10 (D) e 15 (E) dias após aplicação do óleo essencial de <i>Pectis brevipedunculata</i> .	128
Figura 44 - Grupo de morangos no dia do procedimento (A) e com 3 dias (B) após aplicação por <i>spray</i> do óleo essencial de <i>Pectis brevipedunculata</i> .	130
Figura 45 - Gráfico da Contagem Total de Aeróbios Mesófilos em placas com morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos submetidos à aplicação do OE-PB, ME-PB e ME-BRANCO, em todos os tempos de avaliação.	131
Figura 46 - Gráfico da proliferação de fungos em morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos submetidos à aplicação do OE-PB, ME-PB e ME-BRANCO, em todos os tempos de avaliação.	134
Figura 47 - Avaliação da proliferação de fungos provenientes dos morangos da aplicação do OE-PB, da aplicação da ME-PB, da aplicação do ME-BRANCO, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm e morangos não sanitizados, no tempo zero (A), com 3 (B), 7 (C), 10 (D) e 15 (E) dias após o procedimento.	134
Figura 48 - Características macroscópicas (verso e anverso) das colônias com 7 dias de crescimento em meio SDA (Ágar <i>Sabouraud</i> dextrose) acidificado, a 25±3°C e fotografia de microscopia óptica 40x com características microscópicas dos gêneros de fungos filamentosos identificados.	140

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição volátil do óleo essencial extraído das folhas (OE-DU) de <i>Duguetia stelechantha</i> .	50
Tabela 2 - Composição volátil do óleo essencial extraído das cascas (OE-DU-CAS) de <i>Duguetia stelechantha</i> .	54
Tabela 3 - Caracterização da microemulsão obtida do óleo essencial de <i>Duguetia stelechantha</i> (ME-DU) pelo método headspace GC/MS-headspace.	57
Tabela 4 - Caracterização do óleo essencial (OE-PB) extraído de <i>Pectis brevipedunculata</i> empregando o método GC/MS-headspace.	62
Tabela 5 - Caracterização da microemulsão (ME-PB) formulada com óleo essencial (OE-PB) de <i>Pectis brevipedunculata</i> empregando o método GC/MS-headspace.	64
Tabela 6 - Caracterização físico-química do óleo essencial extraído das folhas de <i>Duguetia stelechantha</i> (OE-DU).	70
Tabela 7 - Caracterização físico-química do óleo essencial extraído das partes aéreas de <i>Pectis brevipedunculata</i> (OE-PB).	71
Tabela 8 - Composição da microemulsão.	73
Tabela 9 - Caracterização da microemulsão (ME-DU) formulada com óleo essencial de <i>Duguetia stelechantha</i> e do branco da microemulsão (ME-BRANCO) em relação ao tamanho da partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.	74
Tabela 10 - Caracterização da microemulsão formulada com o óleo essencial extraído de <i>Duguetia stelechantha</i> e do branco da microemulsão (ME-BRANCO) antes e após o teste de estabilidade térmica.	76
Tabela 11 - Caracterização da microemulsão formulada com o óleo essencial extraído das partes aéreas de <i>Pectis brevipedunculata</i> (ME-PB) e do branco da microemulsão (ME-BRANCO).	78
Tabela 12 - Caracterização da microemulsão formulada com óleo essencial extraído das partes aéreas de <i>Pectis brevipedunculata</i> (ME-PB) e do branco da microemulsão (ME-BRANCO) antes e após teste de estabilidade térmica.	80
Tabela 13 - Resultado da atividade antimicrobiana pelo método da difusão em discos dos óleos essenciais extraídos das folhas (OE-DU) e cascas (OE-DU-CAS), e da microemulsão (ME-DU) de <i>Duguetia stelechantha</i> , e seu branco (ME-BRANCO).	81

Tabela 14 - Resultado da atividade antimicrobiana pelo método da diluição em caldo, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais extraídos das folhas (OE-DU) e das cascas (OE-DU-CAS), e da microemulsão (ME-DU) de <i>Duguetia stelechantha</i> , e seu branco (ME-BRANCO).	83
Tabela 15 - Resultado da atividade antimicrobiana pelo método da diluição em caldo, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da microemulsão (ME-DU) de <i>Duguetia stelechantha</i> e seu branco (ME-BRANCO) antes e após teste de estabilidade térmica.	84
Tabela 16 - Resultado da atividade antimicrobiana pelo método da difusão em discos do óleo essencial (OE-PB) e microemulsão (ME-PB) de <i>Pectis brevipedunculata</i> e seu branco (ME-BRANCO).	85
Tabela 17 - Resultado da atividade antimicrobiana pelo método da diluição em caldo, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial (OE-PB) e da microemulsão (ME-PB) de <i>Pectis brevipedunculata</i> e seu branco (ME-BRANCO).	86
Tabela 18 - Resultado da atividade antimicrobiana pelo método da diluição em caldo, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da microemulsão (ME-PB) de <i>Pectis brevipedunculata</i> e seu branco (ME-BRANCO) antes e após teste de estabilidade térmica.	87
Tabela 19 - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox no óleo essencial (OE-DU) e microemulsão (ME-DU) de <i>Duguetia stelechantha</i> , e seu branco (ME-BRANCO) pelo método DPPH.	89
Tabela 20 - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox no óleo essencial (OE-DU) e microemulsão (ME-DU) de <i>Duguetia stelechantha</i> , e seu branco (ME-BRANCO) pelo método ABTS.	90
Tabela 21 - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox no óleo essencial (OE-PB) e microemulsão (ME-PB) de <i>Pectis brevipedunculata</i> , e seu branco (ME-BRANCO) pelo método DPPH.	91
Tabela 22 - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox no óleo essencial (OE-PB) e microemulsão (ME-PB) de <i>Pectis brevipedunculata</i> , e seu branco (ME-BRANCO) pelo método ABTS.	92
Tabela 23 - Valores da concentração de inibição (CI ₅₀), concentração citotóxica (CC ₅₀) e índice de seletividade (I.S) do óleo essencial (OE-DU) de <i>Duguetia</i>	98

stelechantha, da microemulsão preparada com este óleo (ME-DU) e do branco da microemulsão (ME-BRANCO).

Tabela 24 - Valores da concentração inibitória (CI₅₀), concentrações citotóxicas (CC₅₀) e índice de seletividade (I.S) do óleo essencial extraído de *Pectis brevipedunculata* (OE-PB), sua microemulsão (ME-PB) e o branco (ME-BRANCO) contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e a linhagem de células RAW 264.7. 100

Tabela 25 - pH, teor de sólidos solúveis em °BRIX e umidade dos morangos antes e após aplicação do óleo essencial (OE-DU) e da microemulsão (ME-DU) de *Duguetia stelechantha*. 103

Tabela 26 - Perda de peso dos morangos após aplicação do óleo essencial (OE-DU) e da microemulsão (ME-U) de *Duguetia stelechantha*. 104

Tabela 27 - Avaliação da decadência visual, infecção fúngica aparente e taxa de apodrecimento dos morangos após aplicação do óleo essencial (OE-DU) e microemulsão (ME-DU) de *Duguetia stelechantha*. 106

Tabela 28 - Contagem Total de Aeróbios Mesófilos em placas com morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos submetidos à aplicação do OE-DU, ME-DU e ME-BRANCO, em todos os tempos de avaliação. 110

Tabela 29 - Proliferação de fungos em morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos submetidos à aplicação do OE-DU, ME-DU e ME-BRANCO, em todos os tempos de avaliação. 113

Tabela 30 - Características macroscópicas dos fungos com 7 dias de crescimento em meio SDA (Ágar *Sabouraud* dextrose) a 25±3°C, isolados de morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos após aplicação do óleo essencial (OE-DU), microemulsão (ME-DU) de *Duguetia stelechantha* e branco da microemulsão (ME-BRANCO). 118

Tabela 31 - Características microscópicas dos fungos isolado de morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos após aplicação do óleo essencial (OE-DU), microemulsão (ME-DU) de *Duguetia stelechantha* e branco da microemulsão (ME-BRANCO). 119

Tabela 32 - pH, teor de sólidos solúveis totais e umidade dos morangos antes e após aplicação do óleo essencial e da microemulsão de *Pectis brevipedunculata*. 123

Tabela 33 - Perda de peso dos morangos após aplicação do óleo essencial e da microemulsão <i>Pectis brevipedunculata</i> .	125
Tabela 34 - Avaliação da decadência visual, infecção fúngica aparente e taxa de apodrecimento dos grupos de morangos após aplicação do óleo essencial e da microemulsão de <i>Pectis brevipedunculata</i> .	127
Tabela 35 - Contagem Total de Aeróbios Mesófilos em placas com morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos submetidos à aplicação do OE-PB, ME-PB e ME-BRANCO, em todos os tempos de avaliação.	132
Tabela 36 - Proliferação de fungos em morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos submetidos à aplicação do OE-PB, ME-PB e ME-BRANCO, em todos os tempos de avaliação.	133
Tabela 37 - Características macroscópicas dos fungos com 7 dias de crescimento em meio SDA (Ágar <i>Sabouraud</i> dextrose) a $25\pm3^{\circ}\text{C}$, isolados de morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos após aplicação do óleo essencial (OE-PB), microemulsão (ME-PB) de <i>Pectis brevipedunculata</i> e branco da microemulsão (ME-BRANCO).	138
Tabela 38 - Características microscópicas dos fungos isolado de morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos após aplicação do óleo essencial (OE-PB), microemulsão (ME-PB) de <i>Pectis brevipedunculata</i> e branco da microemulsão (ME-BRANCO).	139

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A/O	Água-óleo
ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
AESA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
ANOVA	Análise de Variância (<i>Analysis of Variance</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio (<i>Biochemical oxygen demand</i>)
CC ₅₀	Citotoxicidade Celular de 50%
CCET	Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
CCSO	Centro de Ciências Sociais
CI ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CN	Controle Negativo
CO ₂	Dióxido de Carbono
COLUN	Colégio Universitário
CP	Controle Positivo
CT	Concentração de antioxidantes no tubo de reação
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz (<i>Dynamic Lyght Scattering</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazina
DVB-CAR	Divinilbenzeno-carboxen
EBL	Emulsão Líquida Branco Leitosa
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EHL	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier (<i>Fourier transform infrared</i>)
GC/MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa
HS	<i>Headspace</i>
HS-INJ	Ciclo de Injeção do <i>Headspace</i>
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano

IDA	Ingestão Diária Aceitável
I.S	Índice de Seletividade
IK	Índice de Kovats
IM	Íon Molecular
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
IPD	Índice de Polidispersão
IR _(C)	Índice de Retenção Calculado
IR _(L)	Índice de Retenção da Literatura
MDD	Método de Difusão em Disco
MAPA	Ministro da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ME	Microemulsão
ME-BRANCO	Branco da microemulsão
ME-DU	Microemulsão formulada com óleo essencial extraído das folhas de <i>Duguetia stelechantha</i>
ME-PB	Microemulsão formulada com óleo essencial extraído das partes aéreas de <i>Pectis brevipedunculata</i>
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo tetrazólio
NCCA	Núcleo de Combustíveis, Catálise e Ambiental
O/A	Óleo-água
OE	Óleo essencial
OE-DU	Óleo essencial extraído das folhas de <i>Duguetia stelechantha</i>
OE-DU-CAS	Óleo essencial extraído das cascas de <i>Duguetia stelechantha</i>
OE-PB	Óleo essencial extraído das partes aéreas de <i>Pectis brevipedunculata</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCA	Ágar Padrão de Contagem (<i>Plate Count Ágar</i>)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEBD	Polietileno de baixa densidade
PET	Polietileno tereftalato
pH	pHômetro
PP	Polipropileno
PPM	Partes por milhão
RPM	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memory Institute</i>
SFB	Soro Fetal Bovino

SISGEN	Sistema Nacional para o Gerenciamento do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SDA	Ágar <i>Sabouraud</i> dextrose
ST	Sistema turvo
TACO	Tabela Brasileira da Composição de Alimentos
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>)
TR	Tempo de Retenção
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
TSB	Caldo Triptona de Soja (<i>Tryptic Soy Broth</i>)
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
WI	Winsor I
WII	Winsor II
WIII	Winsor III
WIV	Winsor IV
ZnSe	Seleneto de Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 <i>Duguetia stelechantha</i>	24
2.2 <i>Pectis brevipedunculata</i>	25
2.3 <i>Tecnologia das microemulsões: propriedades e aplicações</i>	27
2.4 <i>Microemulsões no tratamento de doenças: uma alternativa para o controle da Leishmaniose</i>	29
2.5 <i>Microemulsões aplicadas em alimentos: uma metodologia de conservação</i>	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 <i>Coleta do material vegetal</i>	36
3.2 <i>Obtenção dos óleos essenciais</i>	37
3.3 <i>Desenvolvimento das microemulsões e incorporação dos óleos essenciais</i>	38
3.4 <i>Caracterização química dos óleos essenciais e microemulsões</i>	39
3.5 <i>Caracterização físico-química dos óleos essenciais</i>	39
3.6 <i>Caracterização físico-química das microemulsões</i>	40
3.7 <i>Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e microemulsões</i>	40
3.8 <i>Avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais e microemulsões</i>	42
3.9 <i>Atividade leishmanicida dos óleos essenciais e microemulsões em Leishmania. (L.) amazonensis</i>	45
3.10 <i>Citotoxicidade dos óleos essenciais e microemulsões em células RAW 264.7</i>	46
3.11 <i>Ensaio de viabilidade celular de promastigotas de Leishmania (L.) amazonensis e macrófagos RAW 264.7</i>	46
3.12 <i>Aplicação dos óleos essenciais e microemulsões em morangos</i>	47
3.13 <i>Análise estatística</i>	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 <i>Caracterização química dos óleos essenciais e microemulsões</i>	50
4.1.1 <i>Caracterização química dos óleos essenciais e da microemulsão de Duguetia stelechantha</i>	50
4.1.2 <i>Caracterização química do óleo essencial e da microemulsão de Pectis brevipedunculata</i>	61
4.2 <i>Caracterização físico-química dos óleos essenciais</i>	70
4.2.1 <i>Caracterização físico-química do óleo essencial de Duguetia stelechantha</i>	70
4.2.2 <i>Caracterização físico-química do óleo essencial de Pectis brevipedunculata</i>	71
4.4 <i>Caracterização físico-química das microemulsões</i>	73
4.4.1 <i>Caracterização físico-química da microemulsão de Duguetia stelechantha</i>	73

4.4.2 Caracterização físico-química da microemulsão de <i>Pectis brevipedunculata</i>	77
4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e microemulsões	81
4.5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e da microemulsão de <i>Duguetia stelechantha</i>	81
4.5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e da microemulsão de <i>Pectis brevipedunculata</i>	84
4.6 Avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais e microemulsões	88
4.6.1 Avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais e da microemulsão de <i>Duguetia stelechantha</i>	88
4.6.2 Avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial e da microemulsão de <i>Pectis brevipedunculata</i>	91
4.7 Atividade leishmanicida dos óleos essenciais e microemulsões contra <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	93
4.7.1 Atividade leishmanicida do óleo essencial e da microemulsão de <i>Duguetia stelechantha</i> contra <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	93
4.7.2 Atividade leishmanicida do óleo essencial e da microemulsão de <i>Pectis brevipedunculata</i> contra <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	95
4.8 Citotoxicidade dos óleos essenciais e microemulsões em células RAW 264.7	97
4.8.1 Citotoxicidade do óleo essencial e da microemulsão de <i>Duguetia stelechantha</i> em células RAW 264.7	97
4.8.2 Citotoxicidade do óleo essencial e da microemulsão de <i>Pectis brevipedunculata</i> em células RAW 264.7	99
5 CONCLUSÃO	143
REFERÊNCIAS	151
ANEXOS	170

1 INTRODUÇÃO

A flora brasileira apresenta, entre a sua biodiversidade, distintas variedades de plantas dos mais diferentes biomas do país, que podem fornecer substâncias químicas ou bioprodutos com aplicação tecnológica.

Duguetia stelechantha (Diels) R.E.Fr., conhecida popularmente como ata brava, pertence ao Gênero *Duguetia* e à Família Annonaceae. Espécies do gênero *Duguetia* já apresentam identificados metabólitos como alcalóides, terpenos, flavonóides, entre outros. Em que destacam-se alguns constituintes que são considerados marcadores quimiofenéticos de espécies de *Duguetia*, que são: germacreno D, biciclogermacreno, espatulenol, óxido de cariofileno, epóxido de humuleno II, viridifloreno, β -pineno, α -pineno e β -cariofileno (SANTOS *et al.*, 2022). Esses compostos são responsáveis por desempenhar várias atividades biológicas e químicas, como antimicrobiana, antioxidante, anticâncer e mais (FERNANDES, 2012; MAAS *et al.*, 2003; BORGES *et al.*, 2014; NGOUONPE *et al.*, 2019).

Pectis brevipedunculata (Gardner) Sch. Bip. pertence à Família Asteraceae, ao Gênero *Pectis* L., e é nomeada comumente de alecrim do campo. As folhas da espécie contêm entre os compostos majoritários o citral, que consiste em uma mistura dos monoterpenos oxigenados isoméricos neral e geranial. O citral é considerado um marcador químico dos OEs de várias espécies do gênero *Pectis*, como *P. apodocephala*, *P. angustifolia*, *P. brevipedunculata*, *P. ciliares*, *P. elongata*, *P. jangadensis* e *P. linifolia* (MARQUES *et al.*, 2013). e tem efeito antimicrobiano, nematicida e larvicida (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; MARQUES *et al.*, 2013).

Assim, infere-se que estes vegetais, *D. stelechantha* e *P. brevipedunculata*, possuem potencial biotecnológico a ser explorado, podendo ser utilizados para diversos fins, como químico, biológico, farmacológico e outros que possam ser pesquisados. O potencial biotecnológico das espécies vegetais selecionadas para este estudo é investigado pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Química dos Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Campus São Luís-Bacanga, onde observa-se diferentes atividades

A tecnologia de microemulsões vem alcançando resultados promissores na otimização de atividades biológicas através do aumento da biodisponibilidade de princípios bioativos (RAMOS *et al.*, 2021). As microemulsões são sistemas nanométricos isotrópicos e opticamente transparentes, formados por fase aquosa, oleosa e surfactantes (CIRÍACO *et al.*, 2020). Sistemas microemulsionados vêm sendo empregados na solubilização de compostos, principalmente aqueles de caráter lipofílico, como os óleos essenciais (SILVA *et al.*, 2015).

As formulações de microemulsões podem ser utilizadas, entre várias vias de uso, para conservar e aumentar o tempo de vida útil de alimentos (SILVA *et al.*, 2015), como o morango, que apresenta uma camada superficial frágil, que pode ser danificada com certa facilidade, além de apresentar teores elevados de açúcares; baixo pH; atividade de água ideal, entre outros fatores que possibilitam o surgimento e desenvolvimento de microrganismos (VU *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2019), que podem ser inibidos pelo uso de formulações.

As microemulsões também podem ser aplicadas para desenvolver fármacos, configurando-se como recurso alternativo para doenças que são tratadas com drogas que apresentam certas limitações ou resistência parasitária, como a Leishmaniose, que é uma doença infecciosa, não contagiosa, que não confere imunidade ao homem e tem abrangência mundial, afetando 1 milhão de pessoas por ano no mundo. No Brasil registra-se 21.000 casos por ano e no Maranhão, apenas no ano de 2022, registrou-se 1.553 casos, sendo o estado com maior índice da região Nordeste, e o segundo com mais notificações da doença no país, com números inferiores apenas ao estado do Pará, da região Norte. Esta é uma doença negligenciada e que gera um problema de saúde pública (BRASIL, 2024a,b).

Pelo exposto, nota-se a relevância das microemulsões em diversas áreas. Não há relatos na literatura sobre microemulsões com a incorporação de óleos essenciais de *Duguetia stelechantha* e *Pectis brevipedunculata*. Assim, este trabalho surge com este caráter inovador, utilizando estes produtos naturais que a flora maranhense nos oferta.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Obter óleos essenciais de *Duguetia stelechantha* e *Pectis brevipedunculata*, analisar a composição química dos óleos essenciais obtidos, desenvolver microemulsões com os óleos essenciais incorporados, e avaliar o potencial biotecnológico das espécies, por meio da avaliação de atividade antimicrobiana, antioxidante e leishmanicida.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Obter óleos essenciais de *Duguetia stelechantha* e *Pectis brevipedunculata*;
- Caracterizar quimicamente os óleos essenciais obtidos de *D. stelechantha* e *P. brevipedunculata*;

- Desenvolver microemulsões para incorporação dos óleos essenciais de *D. stelechantha* e *P. brevipedunculata*;
- Caracterizar quimicamente as microemulsões obtidos de *D. stelechantha* e *P. brevipedunculata*;
- Realizar caracterização físico-química dos óleos essenciais e microemulsões de *D. stelechantha* e *P. brevipedunculata*;
- Verificar a ação antimicrobiana dos óleos essenciais e microemulsões de *D. stelechantha* e *P. brevipedunculata*;
- Avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais e microemulsões de *D. stelechantha* e *P. brevipedunculata*;
- Investigar a atividade leishmanicida dos óleos essenciais e microemulsões de *D. stelechantha* e *P. brevipedunculata* em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*;
- Avaliar a citotoxicidade dos óleos essenciais e microemulsões de *D. stelechantha* e *P. brevipedunculata* em células RAW 264.7;
- Aplicar os óleos essenciais e microemulsões de *D. stelechantha* e *P. brevipedunculata* em alimento;
- Avaliar a ação dos óleos essenciais e microemulsões de *D. stelechantha* e *P. brevipedunculata* frente à aeróbios mesófilos e fungos presentes em morangos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Duguetia stelechantha*

Duguetia stelechantha (Diels) R.E.Fr., conhecida popularmente como ata brava, envira amarela, envira jararaca, envirataia e invira, pertence ao Gênero *Duguetia* e à Família Annonaceae e possui como sinônimo para a espécie *Aberemoa stelechantha* (SIBBR, 2023).

D. stelechantha R.E.Fr. é uma árvore não endêmica do Brasil, que é distribuída geograficamente nos estados do Amazonas, Pará e Rondônia e é encontrada também na Colômbia e Bolívia (LOBÃO, 2023; GBIF, 2023). Com a autoria de Fries, R. E. (1919), a espécie foi publicada pela primeira vez em *Acta Horti Berg.* 6(6): 17, em 1919. O seu material botânico vem sendo depositado em acervos de herbários, como no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), do *The New York Botanical Garden Herbarium*, do Museu Paraense Herbário Emilio Goeldi, do Herbário do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, entre outros (GBIF, 2023; ROYAL BOTANIC GARDENS, 2023).

A árvore de *D. stelechantha* atinge até 20m de altura, presente em florestas de terra firme e florestas de várzea no bioma Amazônia. O tronco da árvore pode apresentar caroços, por onde surgem as inflorescências. As folhas do vegetal tem formato de lâminas estreitamente elípticas ou oblongos elípticas, a face superior das folhas apresenta nervura central impressa de 11 a 20 nervuras secundárias e a face inferior das folhas é densamente coberta por escamas inteiras (nas folhas maiores) ou estreladas (nas folhas menores). A base é obtusa à aguda. As flores têm forma do botão-floral largamente ovoide, de coloração creme e têm antese diurna. E os frutos têm forma globosa e cor marrom (Figura 1) (LOBÃO, 2023; RIBEIRO *et al.*, 1999).

Figura 1 - Árvore, folha, flor e frutos de *Duguetia stelechantha*.



Fonte: Autora (2024).

A espécie *D. stelechantha* é pouco estudada química e biologicamente. Não havendo descrito na literatura, até o momento, a composição química volátil de *D. stelechantha*. Das investigações realizadas consta na literatura um número reduzido de trabalhos disponíveis sobre

este vegetal, dos quais destacam-se estudos químicos de linhagens de fungos e bactérias endofíticos isolados desta espécie (SOUZA, 2012; SOUSA *et al.*, 2012; KOOLEN *et al.*, 2013; BARBOSA, 2009; BEZERRA *et al.*, 2019; GUIMARÃES *et al.*, 2019).

Algumas espécies do gênero *Duguetia* já tiveram várias classes de metabólitos identificadas, como alcaloides, terpenos, esteróides, flavonóides e acetogeninas (FERNANDES, 2012). Muitos desses metabólitos têm demonstrado resultados promissores em relação às atividades biológicas de muitas espécies do gênero *Duguetia*, apresentando potencial antimicrobiano, antioxidante, anticâncer, antinociceptiva, antiinflamatória, entre outros (MAAS *et al.*, 2003; BRASTIANOS *et al.*, 2007; FERNANDES, 2012; BORGES *et al.*, 2014; NGOUONPE *et al.*, 2019). Nesse sentido, postulamos que *D. stelechantha* contenha em sua composição metabólitos secundários com potencial biotecnológico que podem ser aproveitados para desenvolver atividade biológicas e como fonte de novos fármacos

2.2 *Pectis brevipedunculata*

Pectis brevipedunculata (Gardner) Sch. Bip. pertence à Família Asteraceae e ao Gênero *Pectis* L. A espécie possui os seguintes sinônimos: *Lorentea brevipedunculata* Gardner, *Pectis apodocephala* Baker e *Pectis rubiacea* Baker (GBIF, 2023b).

Respondendo popularmente pelos nomes de alecrim do campo, capim-santo, catinga de formiga, limãozinho e capim-limão (VÁSQUEZ *et al.*, 2014; MAGALHÃES *et al.*, 2020; GBIF, 2023). *P. brevipedunculata* é uma planta de porte herbáceo endêmica do Brasil, que apresenta-se distribuída nos biomas caatinga e cerrado, ocorrendo de forma anual ou perene em alguns estados das regiões brasileiras, como Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia, Goiás, Brasília, Minas Gerais e Rio de Janeiro (SALGADO; GUTIÉRREZ, 2023).

Com a autoria de Sch. Bip (1.856), a espécie foi publicada pela primeira vez em Bot. Voy. Herald [Seemann], em 1.856. E o seu material botânico vem sendo depositado em acervos de herbários, como no Royal Botanic Gardens, The New York Botanical Garden, Maranhão Herbarium, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology Herbarium (GBIF, 2023).

É uma planta de porte pequeno, medindo de 2 a 26 cm de altura, nativa de ambiente xerófilo, surge de forma espontânea em gramados e em campos não cultivados, sendo caracterizada como grama aromática ornamental (MENDONÇA *et al.*, 2002; MARQUES *et al.*, 2013; SALGADO; GUTIÉRREZ, 2023). A planta apresenta flores dimórficas, com corola ligulada amarela de 3,5-4,5 mm de comprimento, com corola tubular amarela. As folhas são opostas e sésseis, com a base do limbo envolvendo o caule. As faces das folhas são formadas

por células volumosas e a epiderme é unisseriada (Figura 2) (AZEVEDO, 2007; SALGADO; GUTIÉRREZ, 2023). As folhas de *P. brevipedunculata* apresentam aroma que lembra o capim-limão, conhecido por seu aroma cítrico e semelhante ao limão e frequentemente usado em aplicações culinárias e medicinais (MARQUES *et al.*, 2013).

Figura 2 - Partes aéreas de *Pectis brevipedunculata*.



Fonte: Autora (2024).

Identificado como principal componente de *P. brevipedunculata*, o citral (formado pelos isômeros neral e geranial) é o responsável pelo efeito calmante da planta, e está relacionado ao uso popular dessa espécie vegetal, que é o consumo da parte aérea como chá (LORENZI; MATOS, 2002; MARQUES *et al.*, 2006; TRINDADE *et al.*, 2005). Além do efeito calmante, o citral presente no OE de *P. brevipedunculata* desempenha efeitos cardiovasculares de hipotensão transitória e bradicardia (MOREIRA *et al.*, 2010), efeitos no sistema nervoso central de ratos (BLANCO *et al.*, 2009), atividade vasodilatadora na aorta torácica isolada de ratos (PEREIRA *et al.*, 2013), potencial inseticida para controle de *Drosophila suzukii* (Matsumura) e apresenta seletividade para organismos não-alvos, as abelhas *Apis mellifera* (Linnaeus) e *Partamona helleri* (Fries) (ARAÚJO *et al.*, 2024). A literatura relata outros usos tradicionais do citral para espécies do gênero *Pectis*, como para ansiedade, hipertensão, problemas intestinais, aromatizante, como remédio para resfriado e febre (MARQUES *et al.*, 2013).

O citral desempenha atividade biológicas, como a atividade antimicrobiana. Marques *et al.* (2013) testaram a ação do óleo essencial de *P. brevipedunculata* contra cepas de bactérias (*Staphylococcus aureus* MRSA, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*) e fungos (*Aspergillus níger*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton rubrum*), confirmando a atividade inibitória do óleo essencial de *P. brevipedunculata*.

Óleos essenciais de outras espécies do gênero *Pectis* (*P. apodocephala* e *P. oligocephala*) têm-se configurado como potencialmente agentes nematicidas e larvicida,

apresentando ação frente à *Meloidogyne incognita* e *Aedes aegypti* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007). Assim, nota-se que espécies de *Pectis* contêm metabólitos secundários, como os terpenos, que desempenham atividades biológicas e podem ser empregados como fonte de novos fármacos, aproveitando assim o potencial biotecnológico da espécie.

A tecnologia de microemulsões tem atingido resultados promissores na otimização de atividades biológicas por meio do aumento da biodisponibilidade de princípios ativos (RAMOS *et al.*, 2021).

2.3 Tecnologia das microemulsões: propriedades e aplicações

As microemulsões (ME) compreendem sistemas nanométricos isotrópicos e opticamente transparentes, termodinamicamente estáveis, formados por fluídos imiscíveis, apresentando tanto uma fase aquosa quanto uma fase oleosa estabilizada por surfactantes, também denominados de tensoativos, podendo ser utilizado ainda um co-surfactante na formulação (CIRÍACO *et al.*, 2020).

O termo microemulsão foi empregado pela primeira no meio científico em 1.959, em razão do trabalho de Schulman e demais pesquisadores (ACHARYA; HARTLEY, 2012). As MEs apresentam componentes e estruturas semelhantes às nanoemulsões. Mas diferenciam-se deste último sistema por conta das propriedades físicas e físico-químicas, além de algumas outras características: as proporções dos constituintes utilizados nos sistemas são diferentes, os surfactantes presentes nas MEs encontram-se em maiores concentrações, de 15 a 30%, que nas nanoemulsões; as dimensões das partículas das MEs, apesar da nomenclatura, encontram-se em escala nanométrica e não micrométrica, dessa forma, as MEs apresentam partículas com dimensões inferiores às das nanoemulsões; as MEs apresentam maior estabilidade termodinâmica, enquanto as nanoemulsões apresentam estabilidade cinética; as microemulsões apresentam maior estabilidade temporal, entre outras diferenças (ANTON; VANDAMME, 2011; MCCLEMENTS, 2012; BRUXEL *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2021).

No desenvolvimento de MEs, a ordem de incorporação dos componentes e a velocidade de agitação não interferem nas características do sistema. A estabilidade temporal das MEs permite que as propriedades das MEs sejam mantidas sem coalescência, que é união e aumento do tamanho das partículas, e sem sedimentação, que é a movimentação das partículas dispersas para parte inferior, com o passar do tempo (RAMOS *et al.*, 2021).

A identificação dos constituintes da formulação, assim como a proporção ideal de cada um deles é realizada através do diagrama de fases pseudotemários. O diagrama, na forma de um triângulo equilátero, representa em cada um de seus vértices os componentes selecionados para o sistema, e em

cada um dos seus lados encontram-se as variações nas concentrações dos componentes. A análise do diagrama indica as proporções para um sistema fisicamente estável e que irá apresentar as propriedades físico-químicas desejadas, como viscosidade, estabilidade, potencial hidrogeniônico, entre outras (FURLANETTO *et al.*, 2011; SINGLA; PATANJALI, 2013).

A interpretação do diagrama de fases possibilita ainda determinar as regiões de transição entre emulsões e os tipos de sistemas que podem formar dependendo da natureza dos componentes e do número de fases líquidas presentes. Essa classificação foi proposta por Winsor e as regiões são: Winsor I, região bifásica formada por uma fase oleosa em equilíbrio com uma fase emulsionada; Winsor II, região bifásica constituída de uma fase aquosa em equilíbrio com uma fase emulsionada; Winsor III, região trifásica formada por uma fase aquosa e outra oleosa, separadas por uma fase emulsionada, denominado de sistema bicontínuo; Winsor IV, região monofásica, sem excesso de fase oleosa ou aquosa, formada por uma emulsão homogênea, considerada a microemulsão (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

As MEs podem ser do tipo óleo-água (O/A) e água-óleo (A/O). Na microemulsão óleo-água (O/A) predomina a fase aquosa, e quando em diluição infinita tende a formar micelas mistas, composta pela fase oleosa contida e dissolvida no interior hidrofóbico da micela. Na microemulsão água-óleo (A/O) predomina a fase oleosa, e quando em diluição infinita forma micelas reversas, compostas pela fase aquosa dissolvida nas micelas inversas, contendo fase oleosa no exterior (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

As MEs O/A ou A/O proporcionam a solubilização de substâncias, o que permite a incorporação de vários tipos de compostos tanto na fase aquosa quanto na fase oleosa. Independente dessas fases encontrarem-se na parte interna ou externa nas micelas formadas.

Os surfactantes utilizados nas MEs são compostos anfipáticos, que possuem caráter lipofílico e hidrofílico em suas moléculas, e por esta razão facilitam e estabilizam a formação de partículas nas MEs (RAMOS *et al.*, 2021). Os surfactantes são classificados conforme o equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) presente na molécula. O EHL varia numericamente de 1 a 20 e tem relação com a afinidade do surfactante com a fase oleosa ou com a fase aquosa (RAMOS *et al.*, 2021).

Os surfactantes são diferenciados em não iônicos, catiônicos, aniônicos ou anfóteros, que apresentam os grupos aniônico e catiônico (SILVA *et al.*, 2015). Entre os surfactantes disponíveis, optou-se por trabalhar neste estudo com o Tween 80 (Monooleato de sorbitan etoxilado ou Polissorbato 80) e Transcutol P (Dietilenoglicol monoetil éter). O Tween 80, surfactante não iônico, derivado de sorbitano polietoxilado e ácido oleico, é um éster considerado um agente solubilizante, apresentando valor EHL de 15. O Tween 80 está entre os surfactantes fisiologicamente aceitáveis (SILVA *et al.*, 2015; FERREIRA, 2013). Sendo

amplamente empregado na elaboração de alimentos e cosméticos, assim como em formulações de aplicação farmacológica, em medicamentos para uso tópico, parenteral e intravítreo, além do uso na produção de vacinas e vitaminas (DALLARMI *et al.*, 2012; OLIVEIRA, 2014b; ARNON-RIPS *et al.*, 2019; DAMICO *et al.*, 2017; CHAUDHARYA *et al.*, 2020).

O Transcutol é um álcool de cadeia curta, com caráter fracamente anfifílico, apresentando EHL de 4. O Transcutol é considerado um co-tensoativo, que pode ser utilizado em associação com outros surfactantes, como Tween 80, no preparo de formulações. Considerado um agente estabilizador, tem propriedades solubilizantes, e pode ser utilizado como intensificador de permeação de medicamentos, apresentando a capacidade de retenção cutânea de fármacos e de cosméticos, sendo assim um tensoativo adequado para formulações de uso tópico (OLIVEIRA, 2014a; FERREIRA, 2013).

Formulações, como as microemulsões, aumentam a biodisponibilidade dos princípios ativos, otimizando sua atividade biológica, reduzindo a toxicidade dos compostos, acelerando a velocidade de liberação e melhorando a eficácia clínica dos fármacos, além de aumentar a estabilidade de nutrientes, fármacos e cosméticos e otimizar a conservação dos alimentos, entre outras melhorias (NEVES, 2013; SILVA *et al.*, 2015).

Considerando as possíveis aplicação das microemulsões, optou-se neste estudo por investigar o potencial antiparasitário, analisando a microemulsão no tratamento de doenças e como uma alternativa para o controle da Leishmaniose, além de investigar o potencial antimicrobiano, verificando o efeito dessas formulações na inibição de bactérias e fungos em alimentos a fim de otimizar a conservação destes.

2.4 Microemulsões no tratamento de doenças: uma alternativa para o controle da Leishmaniose

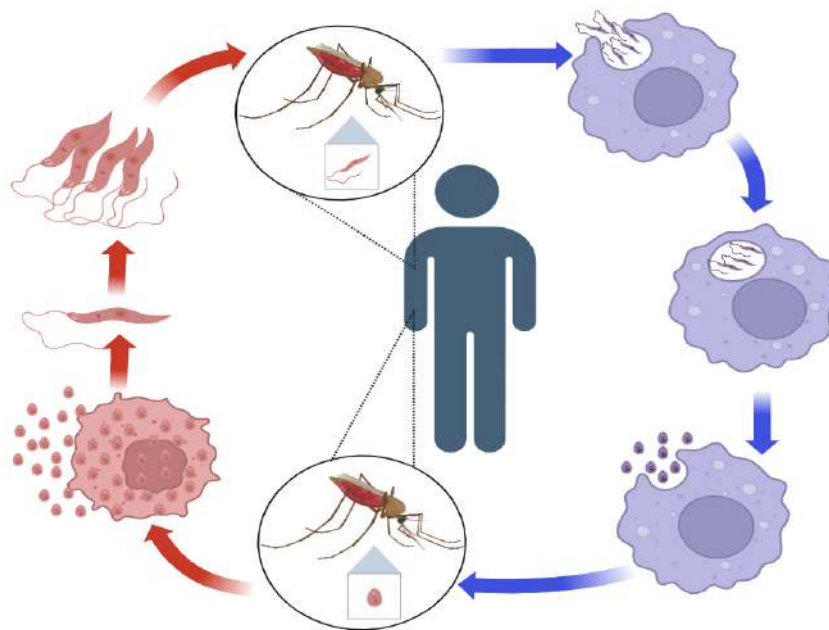
A Leishmaniose tegumentar é uma doença infecciosa, não contagiosa, transmitida ao homem por fêmeas de flebotomíneos (gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*) infectadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Os vetores da leishmaniose são conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira e birigui (BRASIL, 2024c; WHO, 2023).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são considerados parasitos intracelulares obrigatórios e apresentam-se em duas formas: promastigota, forma flagelada e extracelular presente nos vetores ou hospedeiros invertebrados, e amastigota, forma intracelular presente no hospedeiro vertebrado (AKHOUNDI *et al.*, 2016; COTTON, 2017).

O ciclo de vida dos protozoários de *Leishmania* é conceituado como digenético ou heteroxênico, e ocorre de forma alternada em hospedeiros invertebrados e vertebrados. Durante

o ciclo, o parasito passa por mudanças morfológicas, transformando-se de promastigotas a amastigotas. O hospedeiro invertebrado, flebotomíneos, infecta-se com as formas amastigotas ao realizar o repasto sanguíneo durante o processo de alimentação sanguínea do vetor, ou seja, ao picar um indivíduo infectado. As amastigotas transformam-se na forma promastigota, e estas multiplicam-se por divisão celular. Para alimentar-se, os hospedeiros invertebrados, os flebotomíneos, fazem novo repasto sanguíneo, onde injetam as formas infectantes no hospedeiro vertebrado. No homem, as promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos, e retornam a forma amastigota, que multiplicam-se por divisão celular, ocorrendo o rompimento do macrófago, e as amastigotas infectam outras células, em seguida modificam-se novamente para as formas promastigotas, que são fagocitados pelos macrófagos. Quando o hospedeiro invertebrado alimenta-se deste indivíduo infectado reinicia o ciclo (Figura 3) (MORAIS, 2015).

Figura 3 – Ciclo de vida do protozoário *Leishmania*.



Fonte: Biorender (2024).

A infecção por *Leishmania* não confere imunidade e afeta 1 milhão de pessoas por ano no mundo. No Brasil, as ocorrências de casos chegam a cerca de 21.000 casos por ano. A região Norte apresenta o maior coeficiente de contaminação, de 46,4 casos a cada 100.000 habitantes, seguida das regiões Centro-Oeste (17,2 casos/10.000 habitantes) e Nordeste (8 casos/100.000 habitantes) (BRASIL, 2024a,b; WHO, 2023). Entre os estados que mais destacam-se com a incidência de Leishmaniose está o Maranhão. Em 2022, registrou-se 1.553 casos, sendo o estado com maior índice da região Nordeste, e a segunda Unidade da Federação com mais

notificações da doença no país, com números inferiores apenas ao estado do Pará (2.947), da região Norte. Sendo assim, o Maranhão é considerado um dos estados mais afetados pela Leishmaniose no Brasil (BRASIL, 2024b). Nos casos de Leishmaniose tegumentar identificados no Brasil há 7 espécies de *leishmanias* envolvidas, e destacam-se: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* (BRASIL, 2024c).

O diagnóstico da Leishmaniose tegumentar é feito por métodos parasitológicos e o período de incubação no homem, tempo que os sintomas começam a aparecer desde a infecção, é de, em média, 2 a 3 meses. A doença causa úlceras na pele e nas membranas mucosas em humanos (BRASIL, 2024c).

As Diretrizes para o Tratamento da Leishmaniose na Região das Américas (PAHO, 2022) indica os tratamentos para a doença, que podem ser local ou sistêmico, a depender da forma clínica da doença. A indicação de tratamento local varia de acordo com alguns critérios, como o número e dimensão das lesões. A intervenção pode ser por antimoniais intralesionais administrados por injeção subcutânea, ou por creme tópico de paromomicina, e é indicado também o uso da termoterapia, que é a aplicação de calor local com dispositivo eletromagnético. Para os tratamentos sistêmicos são indicados: a administração oral de miltefosina, a pentamidina isetionato por via de administração intramuscular, antimoniais pentavalente por via intravenosa ou intramuscular (PAHO, 2022).

Existem diretrizes para os tratamentos de casos especiais em adultos com Leishmaniose cutânea, como em caso de gravidez, a intervenção deve ser por anfotericina B lipossomal ou termoterapia; durante a amamentação, mulheres devem ser tratadas com antimoniais intralesionais por injeção subcutânea, ou com anfotericina B lipossomal de forma intravenosa ou por termoterapia; pacientes com alterações no eletrocardiograma devem utilizar a miltefosina oral ou anfotericina B lipossomal intravenosa ou termoterapia; pacientes com doença cardíaca, no rim, ou no fígado o tratamento local ocorre com antimoniais intralesionais ou termoterapia, e o tratamento sistêmico anfotericina B lipossomal intravenosa; pacientes com HIV e outras causas de imunossupressão são tratados com anfotericina B desoxicolato por via intravenosa; pacientes com Leishmaniose cutânea disseminada devem receber tratamento com anfotericina B lipossomal intravenosa, miltefosina oral, anfotericina B desoxicolato por via intravenosa ou antimoniais pentavalente; pacientes com Leishmaniose cutânea difusa devem utilizar antimoniais pentavalente por via intravenosa ou muscular, pentamidina isetionato intravenosa ou miltefosina oral; e em pacientes com Leishmaniose cutânea atípica causada por *L. infantum* o tratamento local deve ocorrer com a administração de antimoniais pentavalente

com injeção subcutânea intralesional e o tratamento sistêmico deve ser realizado com antimoniais pentavalente na forma intravenosa ou intramuscular (PAHO, 2022).

Essas recomendações podem diferir das orientações dadas a outros continentes, diferente das Américas, ou seja, os esquemas terapêuticos com as vias de administração, doses e outros detalhes podem variar, pois existem diferentes espécies dos protozoários, os ciclos de transmissão podem modificar, entre outros fatores (PAHO, 2022).

Em vias gerais, as terapias atuais para o tratamento da Leishmaniose compreendem a administração de antimoniais pentavalentes, anfotericina B lipossomal, miltefosina, paromomicina, pentamidina, além da termoterapia. Nas Diretrizes para o Tratamento da Leishmaniose na Região das Américas (PAHO, 2022) ainda citam o uso de imidazóis, macrolídeos, alopurinol e o uso da crioterapia, além da possibilidade de combinar terapias (incluindo local e sistêmico).

O mecanismo de ação dessas drogas interfere na bioenergética das formas do parasita, causa a inibição da atividade glicolítica e da via oxidativa dos ácidos graxos, reduzindo a produção de ATP (Adenosina trifosfato) e a biossíntese molecular (ANVERSA *et al.*, 2018).

No geral, essas drogas, no entanto, apresentam certas limitações, como resistência parasitária, acúmulo nos tecidos, casos de toxicidade para células humanas e efeitos colaterais, que podem ser de caráter leve, moderado e grave, tais como: vômitos, náuseas, anorexia, mialgia, dor abdominal, dor de cabeça, arritmia cardíaca, cardiotoxicidade grave, pancreatite, nefrotoxicidade, entre outras reações adversas que podem sinalizar a necessidade de hospitalização e monitoramento rigoroso dos pacientes. Somado a essa série de complicações, tem-se a longa duração da terapia, que pode ocasionar o abandono do tratamento (MENEZES *et al.*, 2015; NETO *et al.*, 2019; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017). Assim, métodos novos e eficazes de controle da doença são necessários.

Nesse sentido, compostos aromáticos e terpenos são exemplos de metabólitos secundários que podem ser empregados no combate à *Leishmania*. Esses compostos podem ser incorporados a determinadas formulações, como as microemulsões, para intensificar seus efeitos. Essas formulações podem ser desenvolvidas para uso tópico, como a proposta neste estudo, que em contato com os parasitos, pode necessitar de uma concentração inibitória inferior à de fármacos de referência para eliminar os protozoários, e essa concentração pode ainda ser inferior à concentração considerada citotóxica, ou seja, a formulação pode ser seletiva para inibir *Leishmania*, e não causar toxicidade às células do hospedeiro vertebrado, o homem. Com essas consequências, tem-se que a formulação torna-se mais eficiente que as drogas que fazem parte de tratamentos padronizados já existentes.

Ressalta-se que a formulação proposta neste estudo é composta por surfactantes aprovados para uso em fármacos. O Tween 80, assim como os demais polissorbatos, estão inclusos na Lista de Insumos Farmacêuticos da Farmacopeia Brasileira, regulamentado pela

ANVISA (ANVISA, 2019). E o Transcutol P é aprovado pela Farmacopeia Europeia (EP - *European Pharmacopoeia*) e Farmacopeia dos Estados Unidos (USP-NF - *United States Pharmacopoeia – NationalFormulary*). O Transcutol P tem registro no Guia de Ingredientes Inativos (FDA *Inactive Ingredient Guide*) da Agência Americana de Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA - *Food and Drug Administration*), sendo descrito a forma farmacêutica tópica e transdérmica. Estudos de segurança para via dérmica descrevem que o Transcutol P puro em humanos é não irritante e não sensibilizante, em teste de sensibilização, e é bem tolerado em teste de irritação aguda, demonstrando assim a segurança de uso deste composto, sendo considerado um excipiente seguro para fármacos (GATTEFOSSÉ, 2020).

2.5 Microemulsões aplicadas em alimentos: uma metodologia de conservação

As microemulsões apresentam um amplo potencial para a indústria alimentícia, pois permitem o encapsulamento de princípios ativos, melhora a biodisponibilidade de compostos funcionais, o que possibilita prolongar a vida útil de alimentos (RAMOS *et al.*, 2021).

Microemulsões vem sendo aplicadas na área de alimentos com diferentes finalidades, como proporcionar a solubilização de ingredientes lipofílicos e incorporá-los em composições de caráter hidrofílicas; além de aumentar a estabilidade de compostos (SILVA *et al.*, 2015).

O uso de microemulsões para obter maior estabilidade química de compostos bioativos, nutrientes, vitaminas e flavorizantes em matrizes alimentares tem gerado resultados promissores (SILVA *et al.*, 2015).

Além dessas aplicações, MEs têm sido desenvolvidas para otimizar atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos, impedir a oxidação lipídica, evitar a alteração de parâmetros de qualidade, como aparência e cor do alimento em decorrência de deterioramento ou de reações indesejadas, como a degradação enzimática (RAMOS *et al.*, 2021).

Para desenvolver esses efeitos, são incorporados nas MEs diversos tipos de compostos, como os OEs, que apresentam em suas composições metabólitos capazes de desempenhar atividade biológicas. Os OEs de de citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle), hortelã (*Mentha x piperita* L. 'Multimentha') e eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) incorporados em MEs apresentaram atividade antioxidante superior que os OEs em suas formas puros (SIENIAWSKA *et al.*, 2019). A estabilidade oxidativa, assim como a estabilidade física e a resistência a variações da temperatura também foram aprimoradas em uma microemulsão do tipo O/A formulada com vitamina E. Pelos bons resultados, a microemulsão foi considerada um potencial veículo de liberação desta vitamina em alimentos (FENG *et al.*, 2009).

A solubilização de compostos tem sido intensificada em sistemas microemulsionados, como ocorreu com o licopeno, que foi solubilizado em ME a uma concentração 10 vezes maior que quando solubilizado em meio lipofílico (SPERNATH *et al.*, 2002). O aumento da solubilização de triglicerídeos também foi observado com a ME desenvolvida com óleo de canola em combinação com *n*-propanol, surfactante e co-surfactante (ABBASI; RADI, 2016).

Compostos flavorizantes, ou seja, aqueles que conferem ou intensificam sabor e aroma ao alimento, quando utilizados em microemulsões resultam no aumento da sua estabilidade química e solubilização. Estudos com substâncias, como óleos cítricos (ZIANI *et al.*, 2012), de menta (FERREIRA *et al.*, 2010) e aromas (EDRIS; MALONE, 2011) em formulações, evidenciam ainda a diminuição de perdas desses compostos por volatilização (FERREIRA *et al.*, 2010).

Microemulsões têm sido utilizadas como nanocarreadores para entrega eficaz de moléculas bioativas. Esse sistema nanotecnológico de fornecimento de compostos pode ser utilizado para melhorar a biodisponibilidade oral, elevar a estabilidade nutracêutica no alimento e no trato gastrointestinal, aumentar a solubilidade nutracêutica em fluidos intestinais e diminuir o metabolismo de primeira passagem no intestino e no fígado (GORANTLA *et al.*, 2022).

Aditivos alimentares conservantes, monolaurato de glicerol e lactato de sódio, apresentaram maior ação antimicrobiana quando incorporados em MEs que na forma isolada (FU *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2008). As MEs otimizam potenciais antimicrobianos, pois aumentam a difusão do produto gerando maior contato com os microrganismos e podem interferir na formação de biofilmes (ZHANG *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2010). Essa ação antimicrobiana estende-se aos fungos, ME a base de OE de Betel (*Piper betle* L.) apresentou efeito inibidor no crescimento de *Aspergillus flavus* em tomates (BASAK; PROSHANTA, 2017).

Diante dos resultados obtidos com as microemulsões, sugere-se que estas possuem potencial para serem utilizadas como os conservantes regulamentados e empregados na indústria alimentícia. Para microemulsões serem aplicadas em alimentos, os surfactantes, que fazem parte da composição da formulação, precisam ser aprovados por órgãos competentes, como a Agência Americana de Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA - *Food and Drug Administration*), Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA - *European Food Safety Authority*), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

O Transcutol P consta na Lista de Aditivos Alimentares da FDA (FDA, 2024) e na Resolução da ANVISA RDC nº 725, de 1º de julho de 2022, que dispõe sobre os aditivos alimentares aromatizantes. Tem a função de diluente de aromatizantes para facilitar a incorporação e dispersão destes em alimentos, e pode ser utilizado para encapsular aromatizantes a fim de protegê-los da evaporação e de possíveis alterações (ANVISA, 2022).

Os polissorbatos são citados na Lista de Aditivos Alimentares Autorizados para uso em Alimentos da Legislação Brasileira, a IN nº 211, de 1º de março de 2023 da ANVISA (ANVISA, 2023). Os limites máximos permitidos de polissorbatos variam de 1.000 a 10.000 mg/kg e a função tecnológica alterna entre emulsificante e estabilizante, dependendo do alimento (ANVISA, 2023). Os polissorbatos também são aprovados como aditivos pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO - *Food and Agriculture Organization*), sendo recomendada a Ingestão Diária Aceitável (IDA) de 25 mg/kg de peso corporal/dia. A indicação decorre da baixa toxicidade aguda destes compostos, não sendo preocupante a genotoxicidade, carcinogenicidade ou toxicidade para o desenvolvimento (EFSA, 2015). Os polissorbatos são um dos surfactantes hidrofílicos mais empregados pela indústria alimentícia, juntamente com proteínas e carboidratos com alto peso molecular (RAMOS *et al.*, 2021).

As microemulsões, assim como as nanoemulsões, nanopartículas poliméricas e lipossomas fazem parte dos sistemas nanoestruturados. A aplicação de nanoestruturas na indústria alimentícia pode ser de forma direta ou indireta. A aplicação direta ocorre com a incorporação de componentes tais como aromas, corantes, antioxidantes, antimicrobianos e compostos biologicamente ativos (vitaminas, ácidos graxos ômega-3, entre outros), no alimento. E a aplicação indireta é a que insere os nanoestruturados em embalagens, sensores, ou em catalisadores (PATHAKOTI *et al.*, 2017).

A aplicação de MEs em alimentos pode ocorrer por pulverização, espalhamento ou imersão. A pulverização pode ser utilizada em formulações de baixa viscosidade, e possibilita uma aplicação uniforme em toda a superfície do alimento. O espalhamento é empregado para aplicar formulações de alta viscosidade, no entanto, esse método pode não oferecer um revestimento uniforme do alimento. A imersão favorece uma camada fina da formulação na superfície do alimento. No entanto, não possibilita controlar a espessura do revestimento formado como nos demais métodos. A eficiência da aplicação depende de alguns fatores, como: tempo de secagem, temperatura e do equipamento de aplicação (RAMOS *et al.*, 2021).

Com base no exposto, pode-se inferir que o uso de MEs com a incorporação de substâncias ativas para proteger o alimento, configura-se como uma estratégia para garantir a resistência do alimento contra agentes contaminantes e deteriorantes, prolongar a vida útil do alimento, e consequentemente, diminuir custos com a conservação dos gêneros alimentícios, garantir a aceitação do consumidor e maximizar o lucro para produtores e comerciantes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos metodológicos ocorreram no Laboratório de Química dos Produtos Naturais; Laboratório de Microbiologia do Controle de Qualidade de Alimentos e Água; Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais; Laboratório de Patologia e Imunoparasitologia; Laboratório de Eletroquímica; Central Analítica do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia (CCET) e Núcleo de Combustíveis, Catálise e Ambiental (NCCA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Campus São Luís-Bacanga; Laboratório de Dermofarmácia da Universidade Federal do Piauí; e Laboratório de Análise e Desenvolvimento de Produtos Naturais e Sintéticos da Universidade Estadual de Maringá.

3.1 Coleta do material vegetal

As coletas das espécies ocorreram no período da manhã. Os materiais vegetais foram identificados e separados com auxílio de instrumento próprio, como tesoura de poda, a fim de preservar no local as raízes das plantas.

O material vegetal de *Duguetia stelechantha* utilizado neste estudo foram as folhas e cascas (300g), coletadas no Município de São Bento-MA, no bairro Grajaú (02°43'56.8"S; 044°51'27.9"W). Esta espécie tem disponibilidade na região definida como Baixada Maranhense, sendo que nas matas ciliares do alto curso do rio Pericumã, da qual o município de São Bento faz parte, o percentual de espécies da família Annonaceae encontradas é de 3,13% (BRAGA *et al.*, 2011). A identificação botânica de *D. stelechantha* é catalogada no Herbário Rosa Mochel, São Luís, Maranhão, Brasil, sob registro nº SLUI005612. Esta espécie foi coletada e registrada de acordo com o Sistema Nacional para o Gerenciamento do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o cadastro AA3D4EE.

O material de *Pectis brevipedunculata* foi coletado no Campus São Luís-Bacanga da UFMA (2°55'21.6"s; 44°30'71.0"w), próximo à entrada principal do Campus, ao Centro de Ciências Exatas e Tecnologia (CCET), ao Centro de Ciências Sociais (CCSO) e ao Colégio Universitário (COLUN). E desta espécie foram utilizadas 300g das partes aéreas. A identificação botânica da espécie é catalogada no Herbário Rosa Mochel, São Luís, Maranhão, Brasil, registrado sob o número 5287; e no Herbário do Maranhão, com número de registro 11.090. A planta é registrada no SISGEN sob o cadastro AAFB38B.

Como já mencionado, as espécies vegetais selecionadas para este estudo, *D. stelechantha* e *P. brevipedunculata*, são espécies que já vinham sendo investigadas pelo Grupo

de Pesquisa do Laboratório de Química dos Produtos Naturais da UFMA, Campus São Luís-Bacanga, sendo também objeto de estudo de outros trabalhos acadêmicos. Integrantes do Grupo de Pesquisa cultivaram a espécie em um espaço cedido pela Universidade, no CCET, onde é observado o desenvolvimento da planta, e foi experimentado ainda o sistema de cultivo por hidroponia.

Complementa-se também que no ambiente de coleta, determinadas áreas de obtenção de *P. brevipedunculata*, no campus da UFMA, foram demarcadas, visando manter as condições ideais para o desenvolvimento da planta, preservar a espécie e conservar o meio ambiente, impedindo a degradação destes.

3.2 Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais (OEs) de *Duguetia stelechantha* (OE-DU: óleo essencial das folhas; OE-DU-CAS: óleo essencial das cascas) e de *Pectis brevipedunculata* (OE-PB) foram extraídos separadamente por hidrodestilação, utilizando o sistema de *Clevenger* (FABROWSKI, 2022). Inicialmente, para a obtenção dos óleos, as amostras vegetais passaram por processo de secagem a temperatura ambiente por 48 horas. Em seguida, as amostras foram fragmentadas com auxílio de uma tesoura, 300g das amostras foram adicionadas em um balão de fundo redondo de 6.000mL, submersas em água destilada e submetidas a uma temperatura de 100°C por 2,5 horas. Após esse período, os OEs foram centrifugados (Centrífuga Centribio, modelo 80-2B, São Paulo, Brasil) a 3.500 RPM (rotações por minuto) por 10 minutos para separação da fase oleosa e aquosa, e foi utilizado para secagem de água residual o sulfato de sódio anidro P.A (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil). Os OEs foram armazenados em recipientes de vidro, *vials*, protegidos da luz e em ambiente refrigerado.

Os rendimentos dos OEs foram calculados com base no peso seco do material vegetal a partir da equação 1 (LIMA *et al.*, 2022):

$$Rendimento = \frac{V_{OE} \times \rho_{OE}}{m_{amostra} - (m_{amostra} \times \%Umidade)} \times 100 \quad (1)$$

Onde,

V_{OE} = Volume do óleo essencial extraído;

ρ_{OE} = Densidade do óleo essencial;

$m_{amostra}$ = Massa da amostra vegetal seca;

%Umidade = Umidade da amostra vegetal seca.

Sendo a densidade dos óleos calculada pela equação 2 com base na massa (m_{OE}) e volume (V_{OE}) do OE:

$$\rho_{OE} = \frac{m_{OE}}{V_{OE}} \quad (2)$$

Considera-se o teor de umidade da amostra vegetal determinado antes da extração do OE, e este foi verificado por um Analisador de Umidade por Infra-vermelho (GEHAKA, modelo IV2500, São Paulo, Brasil). Os parâmetros empregados foram: massa das amostras: 2 g; temperatura de análise: 115°C; e taxa de secagem de 0,01%/minuto (Assunção, 2013).

3.3 Desenvolvimento das microemulsões e incorporação dos óleos essenciais

Para o desenvolvimento da microemulsão foram utilizados os tensoativos Tween 80 (Polissorbato 80, Êxodo Científica, São Paulo, Brasil) e Transcutol P (Dietilenoglicol monoetil éter, Êxodo Científica, São Paulo, Brasil). A microemulsão foi formulada misturando-se os surfactantes na proporção de 1:1 sob agitação magnética (SolidSteel, Piracicaba, Brasil) por 2 minutos a temperatura ambiente, conforme recomendado por Nascimento *et al.* (2023). Em seguida, a fase oleosa, o óleo essencial, foi titulada aos surfactantes nas proporções (peso/peso) 1:9; 2:8; 3:7; 4:6; 5:5; 6:4; 7:3; 8:2 e 9: 1, sob agitação magnética por 3 minutos. Para cada proporção, titulou-se água destilada lentamente nas quantidades de 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8 e 9, ocorrendo agitação magnética constante por 10 minutos. Monitorou-se o comportamento de fase do sistema pseudoternário das 81 formulações, utilizando-se um fundo preto para a inspeção virtual, conforme descrito por Silva *et al.* (2009). A estabilidade dos sistemas foi verificada após o repouso de 24h a temperatura ambiente. Em seguida, a partir das mudanças de aspecto visual registradas, construiu-se o diagrama de fases pseudoternário, plotando-se os pontos no *software* Origin Pro 8.6 (OriginLab Corporation, Northampton, EUA). No diagrama destacam-se as regiões da Classificação de Winsor: WI (Winsor I, sistema bifásico formado por uma fase oleosa em equilíbrio com uma fase emulsionada); WII (Winsor II, sistema bifásico formado por uma fase aquosa em equilíbrio com uma fase emulsionada); WIII (Winsor III, sistema trifásico formado por uma fase aquosa e uma fase oleosa, intermediada por uma fase emulsionada); WIV (Winsor IV, sistema monofásico, a região da microemulsão); além de emulsão líquida branco leitosa e sistema turvo. A partir da análise do diagrama de fases definiu-se a formulação ideal de ME. A ME formulada foi armazenada em local protegido da luz, calor e umidade, e após 48h, de acordo com indicação de Silva *et al.* (2009), foi caracterizada quimicamente e biologicamente.

3.4 Caracterização química dos óleos essenciais e microemulsões

A análise dos OEs foi realizada em um Cromatógrafo a Gás (GC-2010) acoplado a um Espectrômetro de Massa (GC-MS) (GCMS-QP2010 Plus) (Shimadzu, Quioto, Japão). As amostras foram preparadas com 2 µL do óleo diluído em 500 µL de n-hexano. Uma coluna capilar DB-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) foi usada com o gás de arraste hélio flui a uma velocidade linear de 39,5 cm/s e fluxo da coluna 1,0 mL/min, razão de *Split* 1/30. A programação do forno foi de 40°C com rampa de aquecimento de 10°C/min. até 280°C. A temperatura do injetor e fonte de íons foi de 250°C e 200°C, respectivamente. Os índices de retenção foram calculados para todos os componentes voláteis usando uma série homóloga de n-alcanos C8-C20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), segundo a equação linear de Van Den Dool e Kratz (1963). Os componentes dos OEs foram identificados comparando seus índices de retenção e espectros de massa (massa molecular e padrão de fragmentação) com dados armazenados nas bibliotecas de Adams (2007) e NIST (*National Institute of Standards and Technology*) (ADAMS, 2007; LIAS *et al.*, 2022).

Os OEs e as microemulsões foram analisados pelo método GC/MS-headspace, utilizando-se as seguintes condições cromatográficas para voláteis: ciclo: HS-INJ; volume de amostra: 50 µL do OE e 500uL da ME; seringa: 2,5 mL - HS; temperatura de incubação: 85°C; tempo de incubação: 5 minutos; velocidade de agitação - *speed*: 250 rpm; *agi on time*: 10 s; *agi off time*: 2 s; temperatura da seringa: 85°C; velocidade de enchimento: 100 µL/s.

Os OEs e MEs ainda foram caracterizados por espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier transform infrared* - FTIR), onde os espectros de absorção na região do infravermelho médio foram obtidos no equipamento IR *Tracer* 100 (Shimadzu, Quito, Japão), na faixa de 4.000 a 600cm⁻¹, com resolução de 4cm⁻¹ e acúmulo de 50 espectros por verificação. A janela utilizada para a amostra foi de ZnSe e o volume da amostra foi de 20uL. A interpretação dos espectros foi realizada de acordo com Lopes e Fascio (2004) e Donald *et al.* (2010).

3.5 Caracterização físico-química dos óleos essenciais

O pH dos OEs foi avaliado utilizando um potenciômetro digital com eletrodo de vidro (BEL engineering, modelo PHS3BW, Piracicaba, Brasil), previamente calibrado com soluções tampão em pH 4,0 e 7,0, que foi introduzido diretamente na amostra (CIRÍACO *et al.*, 2020). O índice de refração dos OEs foi determinado com um refratômetro de bancada tipo Abbe

(QUIMIS, modelo Q767B, São Paulo, Brasil), a 25°C (CIRÍACO *et al.*, 2020). As densidades dos OEs foram calculadas com base nas massas e nos volumes dos OEs.

3.6 Caracterização físico-química das microemulsões

A aparência das MEs foi determinada por avaliação visual quanto à transparência, separação de fases e a cor do sistema formado. O tamanho das partículas das MEs foi analisado utilizando a técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering* - DLS), que fornece o diâmetro hidrodinâmico em nanômetros das partículas (CIRÍACO *et al.*, 2020). O tamanho das partículas (diâmetro médio z), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta das MEs foram medidos no equipamento Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) a 25°C em um ângulo de incidência de 90°. As MEs foram avaliadas em triplicata, com diluição de 1:100 em água destilada (REIS, 2014).

A reologia foi determinada de acordo com Nascimento *et al.* (2023) em um reômetro de tensão controlada (MARS II, Haake Thermo Fisher Scientific Inc., Alemanha), utilizando a geometria tipo cone/placa de aço (C35/2° Ti) de 35 mm de diâmetro, com distância fixa de 0,105 mm entre as placas. As amostras foram avaliadas na temperatura de 25°C. O tempo de repouso das amostras foi de 1 minuto. Curvas de fluxo foram obtidas variando-se a taxa de cisalhamento de 0 a 500s⁻¹ e de 500 a 0s⁻¹. As curvas foram medidas a cada 150s.

A estabilidade térmica das MEs foi analisada nas temperaturas de -5°C±2°C e 50°C ± 2°C. O ciclo de gelo-degelo foi composto pelo período de 24h em refrigerador (Electrolux, São Paulo, Brasil), e 24h em estufa (SolidSteel, Piracicaba, Brasil). Totalizando 6 ciclos em 12 dias (BRASIL, 2004; FIGUEIREDO, 2013). Antes e após o teste de estabilidade térmica, as MEs foram analisadas a 25°C em relação à densidade, pH e índice de refração (CIRÍACO *et al.*, 2020), e foi verificado também se os princípios ativos, analisados por infravermelho, e a atividade antimicrobiana (BRCAST, 2023; CLSI, 2005; CLSI, 2020) mantiveram-se com a variação da temperatura.

3.7 Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e microemulsões

A atividade antimicrobiana utilizou cepas microbianas provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC), doadas pelo Laboratório de Microbiologia do Controle de Qualidade de Alimentos e Água da UFMA (PCQA-UFMA): *Escherichia coli* (ATCC 25922),

Salmonella spp. (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 35152), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 14579) e *Clostridium* spp. (ATCC 25772).

Para a padronização do inóculo, as cepas microbianas utilizadas foram repicadas em caldo tripton de soja (TSB) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e incubadas em estufa de cultura bacteriológica (Fanem, São Paulo, Brasil) a 35°C até atingirem fase exponencial de crescimento (4 a 6h). Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85% estéril, de modo a se obter uma suspensão microbiana com a turbidez comparável à da solução padrão de *McFarland* 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e das microemulsões foi pelo Método de Difusão em Disco (MDD) (CLSI, 2003); CLSI, 2020; BrCAST, 2023) e pela diluição em caldo, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (CLSI, 2005); (CLSI, 2020).

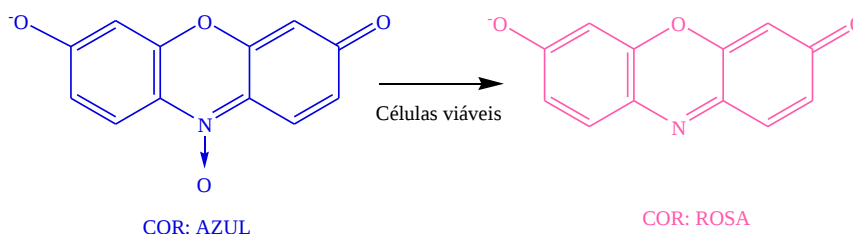
Na inibição bacteriana verificada pelo MDD, empregou-se o Ágar *Mueller Hinton* (Merck, Darmstadt, Alemanha) para distribuição de 75µL da suspensão microbiana. Discos para antibiograma (Laborclin, Paraná, Brasil) contendo 50 µL das amostras dos OEs e MEs foram alocados sobre a superfície do meio de cultura. O controle positivo foi realizado com os antibióticos comerciais Gentamicina (Laborclin, Paraná, Brasil) e Penicilina (Laborclin, Paraná, Brasil). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Após esse período os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados. Esses ensaios foram realizados em triplicata, de acordo com CLSI (2003); BrCAST (2023).

A CIM foi realizada segundo a metodologia da diluição em caldo, proposta pela *National Committee for Clinical Laboratory Standart* (CLSI, 2005). Preparou-se uma solução contendo a amostra (OEs, MEs e o branco das MEs) e dimetilsulfóxido (DMSO) (Êxodo científica, São Paulo, Brasil) a 0,1%, levando-se em consideração que a concentração de 200mg/mL do OE na ME. Uma alíquota de 1.000 µg/mL dessas soluções dos OEs, MEs e do branco das MEs foi acrescentada ao caldo *Mueller Hinton* (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas, resultando nas concentrações de 12.000 a 15,625 µg/mL (12.000; 10.500; 10.000; 8.000; 6.000; 5.000; 4.000; 3.500; 3.000; 2.500; 2.000; 1.500; 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 µg/mL). Uma suspensão microbiana contendo $1,5 \times 10^8$ UFC/mL das bactérias foram adicionadas a cada concentração. Realizou-se o controle negativo, para verificar o crescimento bacteriano, e o controle positivo, com os antibióticos comerciais Ampicilina e Gentamicina, nas concentrações de 128 a 0,015625 µg/mL (128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625 µg/mL). Além do controle do DMSO e do caldo. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas (TELES *et al.*, 2021). E após o período

de incubação, foi verificada a CIM do OE e ME, sendo esta detectada pela ausência de turvação visível nos tubos.

A CIM foi verificada também pelo método colorimétrico utilizando o marcador resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) (Merck, Darmstadt, Alemanha) para indicar a presença de células viáveis, de acordo com Chada (2013), com adaptações. Após o período de incubação aplicou-se nas concentrações testadas 20 µL de solução aquosa estéril de resazurina 1%, incubou-se em estufa a 35°C por 30 minutos, e em seguida observou-se a mudança de coloração. A resazurina possui cor azul, e na presença de células viáveis o composto sofre redução, transformando-se em resofurina e a coloração altera-se para rosa (Figura 4).

Figura 4 - Redução da resazurina em resofurina na presença de células viáveis.



Fonte: Adaptado de Chada (2013).

Portanto, as concentrações que apresentaram coloração rosa, indicam crescimento microbiano devido à inatividade dos OEs e das MEs em estudo, demonstrando não possuir ação bactericida. E aquelas concentrações que apresentaram coloração azul demonstraram que houve inibição do crescimento microbiano. Desta forma, a CIM foi a menor concentração que não sofreu alteração na cor total ou parcial do meio, permanecendo com coloração azul (CHADA, 2013).

3.8 Avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais e microemulsões

Além da atividade antimicrobiana, investigou-se também a propriedade antioxidante, pois há relatos na literatura (MERCIER *et al.*, 2009) sobre a ação antioxidante desenvolvida por compostos majoritários presentes nas amostras, como os monoterpenos α -pineno e β -pineno.

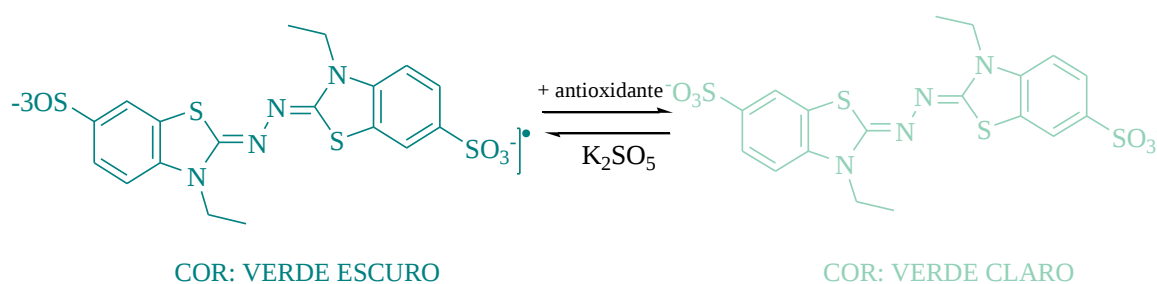
A atividade antioxidante dos OEs e MEs foi avaliada através dos ensaios de captura de radicais livres ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico] e DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), que são métodos adequados para análise de antioxidantes solúveis em meios orgânicos.

A determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) ocorreu de acordo com a metodologia descrita por (TELES *et al.*, 2021), com modificações. A atividade antioxidante foi avaliada usando uma mistura de reação de 5mL de solução de ABTS a 3840µg/mL com 88µL de solução de persulfato de potássio (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil) a 37.840µg/mL. A mistura permaneceu no escuro a temperatura ambiente por 16h, dando origem ao radical ABTS, que foi diluído em álcool etílico absoluto (Neon, São Paulo, Brasil) a fim de alcançar uma absorbância de 0,7 efetuando-se a leitura em espectrofotômetro (Quimis, São Paulo, Brasil) no comprimento de 734 nm. As amostras de OEs foram diluídas em álcool etílico absoluto, em triplicata, para alcançar a mesma concentração das MEs, de 200mg/mL. Transferiu-se uma alíquota de 100µL da amostra diluída para tubos de ensaio com 3mL do radical ABTS. O controle foi realizado com álcool etílico absoluto adicionado em 3mL do radical. O álcool etílico absoluto foi utilizado como branco. Os tubos testes permaneceram no escuro por 6 minutos, e em seguida ocorreu a leitura da absorbância da mistura de reação no espectrofotômetro no comprimento de 734 nm.

O radical ABTS apresenta cor verde escuro e após reação com substância antioxidante, estabiliza o radical (Figura 5) e deve se tornar verde claro ou incolor (SILVEIRA *et al.*, 2018).

O antioxidante padrão utilizado foi o Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), um antioxidante sintético, derivado da vitamina E (α -tocoferol), que é solúvel em água e etanol. A curva padrão do Trolox em meio etanólico foi construída a partir das concentrações de 50 a 1.000 µM (50; 75; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 1.000 µM). A curva de calibração do trolox foi disposta em gráfico, onde as concentrações (µM) foram fixadas no eixo X e as absorbâncias alocadas no eixo Y (SILVEIRA *et al.*, 2018).

Figura 5 - Estabilização do radical livre ABTS.



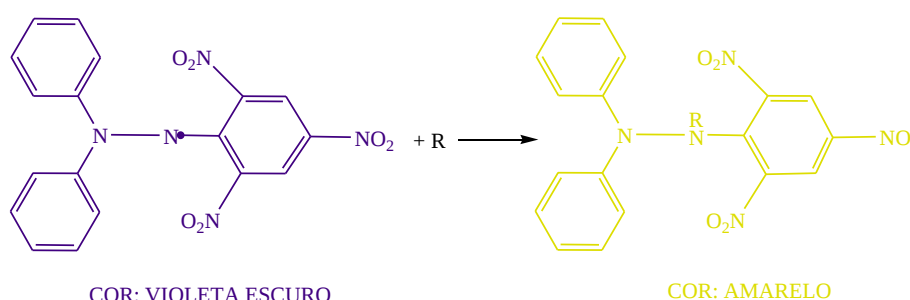
Fonte: RUFINO *et al.* (2007a).

A determinação da atividade antioxidante das amostras pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazina) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi realizada de acordo com Silveira *et*

al. (2018). As amostras de OEs foram diluídas em álcool etílico absoluto, em triplicata, para alcançar a mesma concentração das MEs, de 200mg/mL. O radical DPPH, na concentração de 40µg/mL, foi diluído em álcool etílico absoluto (Neon, São Paulo, Brasil) e deve alcançar uma absorvância de no mínimo 1.000, efetuando-se a leitura em espectrofotômetro UV-visível (Quimis, São Paulo, Brasil) no comprimento de 517 nm. Em tubos, acrescentou-se 100µL da amostra e 3mL do radical DPPH. Após a homogeneização, os tubos permaneceram em ambiente escuro por 30 minutos e após foi realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 517nm. Álcool etílico absoluto foi utilizado como branco. Um tubo foi preparado com 3mL do radical e álcool etílico em substituição às amostras, para controle negativo.

O radical DPPH apresenta cor violeta escuro e após reação com substância antioxidante, estabiliza o radical (Figura 6) e deve se tornar amarelo ou violeta claro (SILVEIRA *et al.*, 2018).

Figura 6 - Estabilização do radical livre DPPH.



Fonte: RUFINO *et al.* (2007b).

Como referência, utilizou-se o padrão Trolox. Onde calculou-se o valor da concentração de antioxidantes no tubo de reação (CT), expressa em concentração equivalente de Trolox, de acordo com a equação 3 (SILVEIRA *et al.*, 2018):

$$CT = \frac{(Abs_{am} - b)}{a} \quad (3)$$

Sendo:

Abs_{am} = absorvância da amostra.

a = coeficiente angular obtido para a curva de Trolox e DPPH

b = coeficiente linear obtido para a curva de Trolox e DPPH.

A atividade antioxidante da amostra foi expressa em capacidade antioxidante total do composto equivalente ao Trolox (µM/grama da amostra), representado por TEAC (*Trolox*

Equivalent Antioxidant Capacity), foi calculada pela equação 4, que considera a quantidade em gramas da amostra e o volume utilizados na análise (SILVEIRA *et al.*, 2018).

$$TEAC_m = CTX \frac{\text{volume}}{\text{massa}} \quad (4)$$

3.9 Atividade leishmanicida dos óleos essenciais e microemulsões em *Leishmania*. (L.) *amazonensis*

Para o ensaio, utilizou-se formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/Br/90/BA125) em fase de crescimento estacionário (4 dias de cultura) com motilidade flagelar foram cultivadas em meio Schneider (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco, São Paulo, Brasil). A cultura foi incubada a 26°C em Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD - *Biochemical oxygen demand*) (Labor, modelo SP-500, São Paulo, Brasil) (BEZERRA *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2012).

As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (5×10^7 células/mL) foram tratados com 12 diferentes concentrações dos OEs e das MEs, de 500 a 0,24 µg/mL (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95; 0,98; 0,49; 0,24 µg/mL), em placas de 96 poços (KASVI, modelo K12-096, São José dos Pinhais, Brasil) contendo um volume final de 100 µL em cada poço, conforme metodologia de Reis *et al.* (2012) com adaptações. Os OEs foram diluídos em DMSO a fim de alcançar a mesma concentração dos OEs nas MEs. Os testes foram realizados em triplicata, com 3 repetições. O controle positivo foi determinado pela droga padrão Pentamidina® (Sanofi aventis, Anagni, Itália) (CI₅₀ 4 µg/mL) nas formas promastigotas cultivadas no meio suplementado com 10% de SFB. O controle negativo foi realizado com o parasito cultivado em meio Schneider suplementado. O meio e o diluente, 0,5% de DMSO, foram controlados juntamente com o parasito cultivado no meio suplementado. Após 48 h de incubação a 26°C no BOD, a motilidade foi avaliada, realizando-se as leituras das placas em um leitor de microplacas (BioTek Instruments, Vermont, EUA) a 540nm. A concentração inibitória de 50% (CI₅₀) foi calculada com os valores de absorbância obtidos. A viabilidade celular das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi avaliada pelo método MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo tetrazólio] (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), conforme descrito posteriormente.

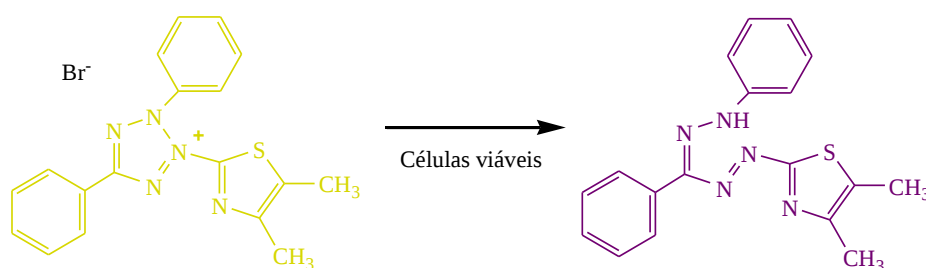
3.10 Citotoxicidade dos óleos essenciais e microemulsões em células RAW 264.7

Para avaliar a citotoxicidade *in vitro*, linhas celulares de macrófagos RAW 264.7 (2×10^5 células/mL) foram utilizadas e cultivadas, a 37°C e 5% CO₂, em uma placa de 96 poços com 12 diferentes concentrações dos OEs e das MEs, de 500 a 0,24 µg/mL (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95; 0,98; 0,49; 0,24 µg/mL). Os testes foram realizados em triplicata, com 3 repetições, segundo a metodologia de Tempone *et al.* (2005), com adaptações. O controle negativo foi verificado com células e meio RPMI (*Roswell Park Memory Institute*) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) suplementado com 10 % SFB. O controle positivo foi determinado com as células e 0,5% de DMSO. O controle do meio RPMI também foi realizado. As placas foram incubadas por 48h a 37°C, após este período, as células foram analisadas no leitor de microplacas a 540 nm. Com os valores de absorbância, os resultados foram usados para calcular a citotoxicidade celular de 50% (CC₅₀). A viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7 foi verificada pelo método MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-brometo de difenil tetrazólio], descrito a seguir.

3.11 Ensaio de viabilidade celular de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e macrófagos RAW 264.7

A viabilidade celular de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e macrófagos RAW 264.7 foi verificada pelo método colorimétrico com MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-brometo de difenil tetrazólio], onde o sal MTT, de coloração amarela e solúvel em água, foi convertido em cristais de formazan, de coloração roxa e insolúveis em água (Figura 7). As células viáveis e metabolicamente ativas após serem convertidas pela atividade da enzima mitocondrial succinato tetrazólio redutase, são quantificadas (MOSMANN, 1983; STOCKERT *et al.*, 2018).

Figura 7 - Reação química da conversão do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil tetrazólio.



Fonte: Autora (2024).

Ao final da incubação, as placas foram centrifugadas (Thermo Fisher Scientific, Abingdon, Inglaterra), e o sobrenadante foi descartado e substituído por novo meio contendo MTT (5 mg/mL). As placas foram incubadas em BOD por 3h, as placas de *L. (L.) amazonensis* a 26°C e as placas dos macrófagos RAW 264.7 a 37°C, e após esse período, as placas foram novamente centrifugadas e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 100µL de DMSO puro. As absorbâncias foram lidas no leitor de microplacas a 540 nm (KUMAR *et al.*, 2018).

Para finalizar o estudo, o Índice de Seletividade (I.S), que determina a segurança de usar a amostra em ensaios *in vivo*, foi calculado pela razão entre CC₅₀ e CI₅₀ (equação 5).

$$I.S = \frac{CC_{50}}{CI_{50}} \quad (5)$$

Quando o I.S. for maior que 1, significa que a amostra apresenta maior toxicidade para o parasito do que para a célula. E quando o I.S. for menor de 1, resulta que a amostra tem maior toxicidade para a célula do que para o parasito. Assim, quanto maior o I.S., mais seletiva a amostra é para o parasito e menos tóxica para a célula (SILVA-SILVA, 2016).

3.12 Aplicação dos óleos essenciais e microemulsões em morangos

A aplicação dos OEs e MEs em alimento ocorreu conforme recomendações de Khan *et al.* (2019) e Arnon-Rips *et al.* (2019). Os morangos (*Fragaria vesca* L.) (Peterfrut, Espírito Santo, Brasil), adquiridos nas Centrais de Abastecimento do Maranhão SA (Ceasa-MA), foram previamente selecionados para o teste de acordo com a uniformidade de tamanho, peso, cor e ausência de danos físicos ou patológicos. Os frutos foram lavados com água corrente, imersos em solução de hipoclorito de sódio (Start, Rio de Janeiro, Brasil) a 200 ppm por 15 minutos para descontaminação e, em seguida, enxaguados com água potável e secos a temperatura ambiente sobre um filtro de nylon (Sbrissa, São Paulo, Brasil). Grupos de 5 (cinco) morangos, em triplicata, foram imersos nas amostras (OEs, MEs e ME-BRANCO - Branco da microemulsão, ou seja, formulação desenvolvida com surfactantes e água destilada, sem acréscimo de óleo essencial) por 30 segundos, a fim de originar um revestimento fino na superfície do fruto, em seguida ocorreu secagem por 1h a temperatura ambiente, em que os morangos foram dispostos em um filtro de *nylon* para drenar o excesso de amostras. Morangos não sanitizados e morangos sanitizados em solução de hipoclorito de sódio constituíram os grupos controles. Os frutos foram embalados em recipientes de Polietileno tereftalato (PET)/ Polietileno de baixa densidade (PEBD)/ Polipropileno (PP) (PRAFEITA IND. E COM. DE

EMBALAGENS LTDA. São Paulo, Brasil) e armazenados a 5°C em refrigerador (Electrolux, São Paulo, Brasil). Os morangos foram examinados no dia do processamento (tempo 0) e em mais quatro tempos, com 3, 7, 10 e 15 dias, em relação à decadência visual, taxa de apodrecimento, perda de peso, umidade, teor de sólidos solúveis totais e pH.

A decadência visual foi examinada nos morangos e foram considerados como deteriorados aqueles que apresentaram lesão visível, de cor escura, que caracteriza área infectada por microrganismos, segundo Khan *et al.* (2019). A taxa de apodrecimento dos morangos foi calculada com o número de frutos podres dividido pelo número inicial de frutos multiplicado por 100 (MELO *et al.*, 2018). A perda de peso dos morangos foi expressa de acordo com Khan *et al.* (2019), que consideram a perda percentual com base no peso inicial e no peso final. A perda de peso dos morangos foi calculada pela equação 6:

$$Perda\ de\ peso\ (\%) = \left(A - \frac{B}{A} \right) \times 100 \quad (6)$$

Onde A é o peso inicial do morango e B é o peso final do morango.

O teor de umidade foi determinado pela secagem direta em estufa (SolidSteel, Piracicaba, Brasil) a 105°C até obter o peso seco (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). O teor de sólidos solúveis totais foi determinado com um refratômetro de bancada tipo Abbe (QUIMIS, modelo Q767B, São Paulo, Brasil) a 20 °C, e os resultados foram expressos como °Brix (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). O pH dos morangos foi avaliado utilizando um medidor de pH digital (BEL engineering, modelo PHS3BW, Piracicaba, Brasil) de acordo com o método padrão descrito em Instituto Adolfo Lutz (2008).

Para a caracterização microbiológica dos morangos, foram pesados 10±0,2 g dos morangos de cada tratamento, que foram adicionados a 90 mL de solução salina estéril a 0,1%, preparada com cloreto de sódio (Ciavikko, Arraial Velho, Brasil), correspondendo à primeira diluição (10⁻¹). Em seguida, diluições sucessivas, de 10⁻² e 10⁻³ foram preparadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina a 0,1%.

A qualidade dos morangos em relação à bactérias e a vida de prateleira, foi investigada pela Contagem Total de Aeróbios Mesófilos em placas, também denominada como Contagem Padrão em Placas. O método utilizado foi o plaqueamento em profundidade (*Pourplate*), onde inoculou-se as amostras em placas de petri estéreis, vertendo-se aproximadamente 15 mL do ágar padrão de contagem (*Plate Count Ágar* - PCA) (Merck, Darmstadt, Alemanha), misturou-se o inóculo com o meio de cultura movimentando suavemente as placas, em seguida, permitiu-se que o meio esfriasse e solidificasse. Foi realizado o controle do ágar. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (Fanem, São Paulo, Brasil) a 37°C por 24h. Após a

incubação, realizou-se a avaliação do crescimento microbiano e a contagem de colônias utilizando um contador de colônias para placas de petri (Phoenix, São Paulo, Brasil). Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama. Os procedimentos seguiram as recomendações da *American Public Health Association* (2015).

Os morangos foram pesquisados ainda sobre a infecção fúngica. Utilizou-se a técnica de enumeração de bolores e leveduras e o método de plaqueamento em profundidade, onde adicionou-se 0,1mL das diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e 15mL do Ágar *Sabouraud* Dextrose (KASVI, Paraná, Brasil) acidificado com solução de ácido tartárico 10%. Foi realizado o controle do ágar. Após o procedimento, as placas foram incubadas em BOD (HydroSan, São Paulo, Brasil) a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 5 dias. Os resultados foram expressos em UFC/g. As análises seguiram as recomendações da *American Public Health Association* (2001).

A identificação macroscópica de fungos filamentosos ocorreu após o período de 7 dias de crescimento, onde foram observadas as características macroscópicas, como superfície, textura, topografia, pigmentação, entre outros, e foram classificadas através da sua presença ou ausência no fungo filamentoso de acordo com o livro “*Larone’s medically important fungi: a guide to identification*” (LARONE *et al.*, 2018). O tamanho das colônias foi verificado pela medição, em mm, do seu diâmetro. A identificação microscópica de fungos filamentosos ocorreu de acordo com o livro “*Larone’s medically important fungi: a guide to identification*” (LARONE *et al.*, 2018). Por meio de observação microscópica das estruturas morfológicas foi verificado a hifa, conídio, conidióforo, fialide, célula pé e vesícula. Utilizou-se a fita-cola para transporte da colônia para a lâmina, com emprego de azul de algodão, e em seguida ocorreu a visualização ao microscópio para identificar as colônias de fungos filamentosos isolados a nível do gênero.

3.13 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Inc., San Diego, EUA), onde os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para obter a média, a concentração inibitória (CI_{50}) e a concentração citotóxica (CC_{50}).

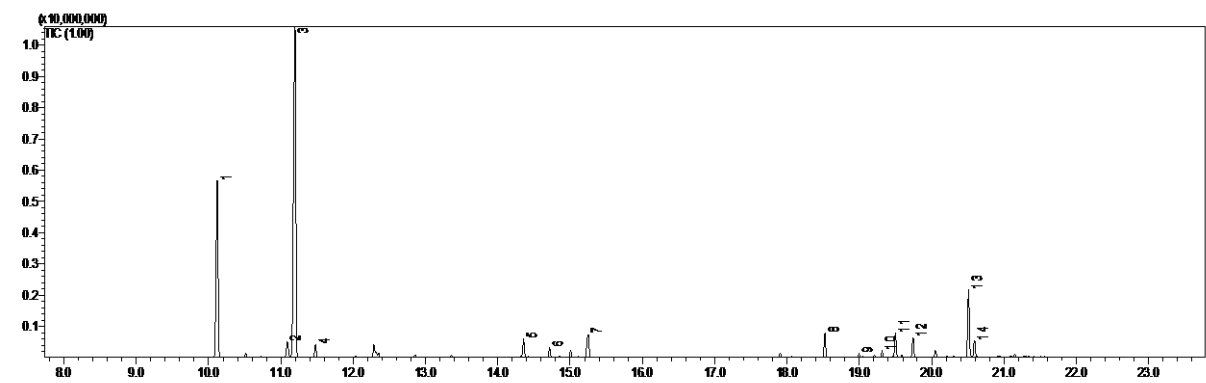
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização química dos óleos essenciais e microemulsões

4.1.1 Caracterização química dos óleos essenciais e da microemulsão de *Duguetia stelechantha*

A composição volátil do OE-DU foi composta por 41 compostos identificados por GC-MS, o que representa 96,4% da composição total do óleo (Figura 8, Figura 9 e Tabela 1).

Figura 8 - Cromatograma GC-MS do óleo essencial extraído das folhas de *Duguetia stelechantha* (OE-DU).



Fonte: Autora (2024).

Tabela 1 - Composição volátil do óleo essencial extraído das folhas (OE-DU) de *Duguetia stelechantha*.

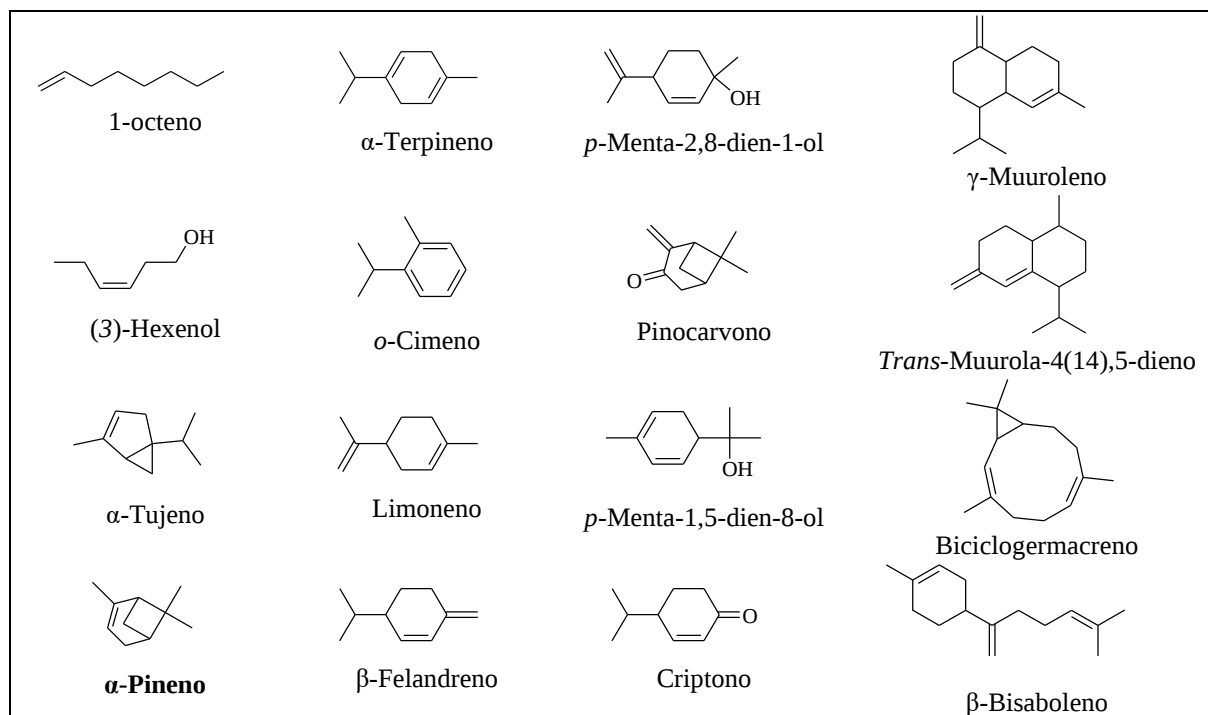
	Constituintes	TR	IR _(L)	IR _(C)	OE-DU %
1	1-Octeno	5.220	788 ¹	783	2,91
2	(3)-Hexenol	7.940	850 ¹	860	0,03
3	α -Tujeno	9.950	924 ¹	926	0,03
4	α-Pineno	10.120	932 ¹	933	20,2
5	Camfeno	10.515	946 ¹	950	0,38
6	Tuja-2,4(10)-dieno	10.620	953 ¹	955	0,02
7	6-Metil-Heptan-2-ol	10.730	958 ¹	959	0,09
8	Sabineno	11.090	969 ¹	974	1,75
9	β-Pineno	11.195	974 ¹	979	46,17
10	Mirceno	11.480	988 ¹	991	1,14
11	<i>p</i> -Menta-1(7),8-dieno	11.760	1003 ¹	1003	0,03
12	α -Terpineno	12.035	1014 ¹	1018	0,12
13	<i>o</i> -Cimeno	12.195	1022 ¹	1026	0,03
14	Limoneno	12.285	1024 ¹	1031	1,18
15	β -Felandreno	12.315	1025 ¹	1033	0,39
16	1,8-Cineol	12.380	1026 ¹	1034	0,35
17	γ -Terpineno	12.855	1054 ¹	1061	0,20
18	Terpinoleno	13.360	1086 ¹	1088	0,18
19	Endo-fenchol	13.980	1014 ¹	1123	0,03
20	α -Camfolenal	14.105	1022 ¹	1131	0,01
21	<i>Trans</i> -Sabinol (trans for OH vs. IPP)	14.355	1137 ¹	1146	1,72
22	<i>p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	14.425	1040 ²	1150	0,08
23	Pinocarvono	14.715	1160 ¹	1168	0,82
24	<i>p</i> -Menta-1,5-dien-8-ol	14.850	1166 ¹	1176	0,15

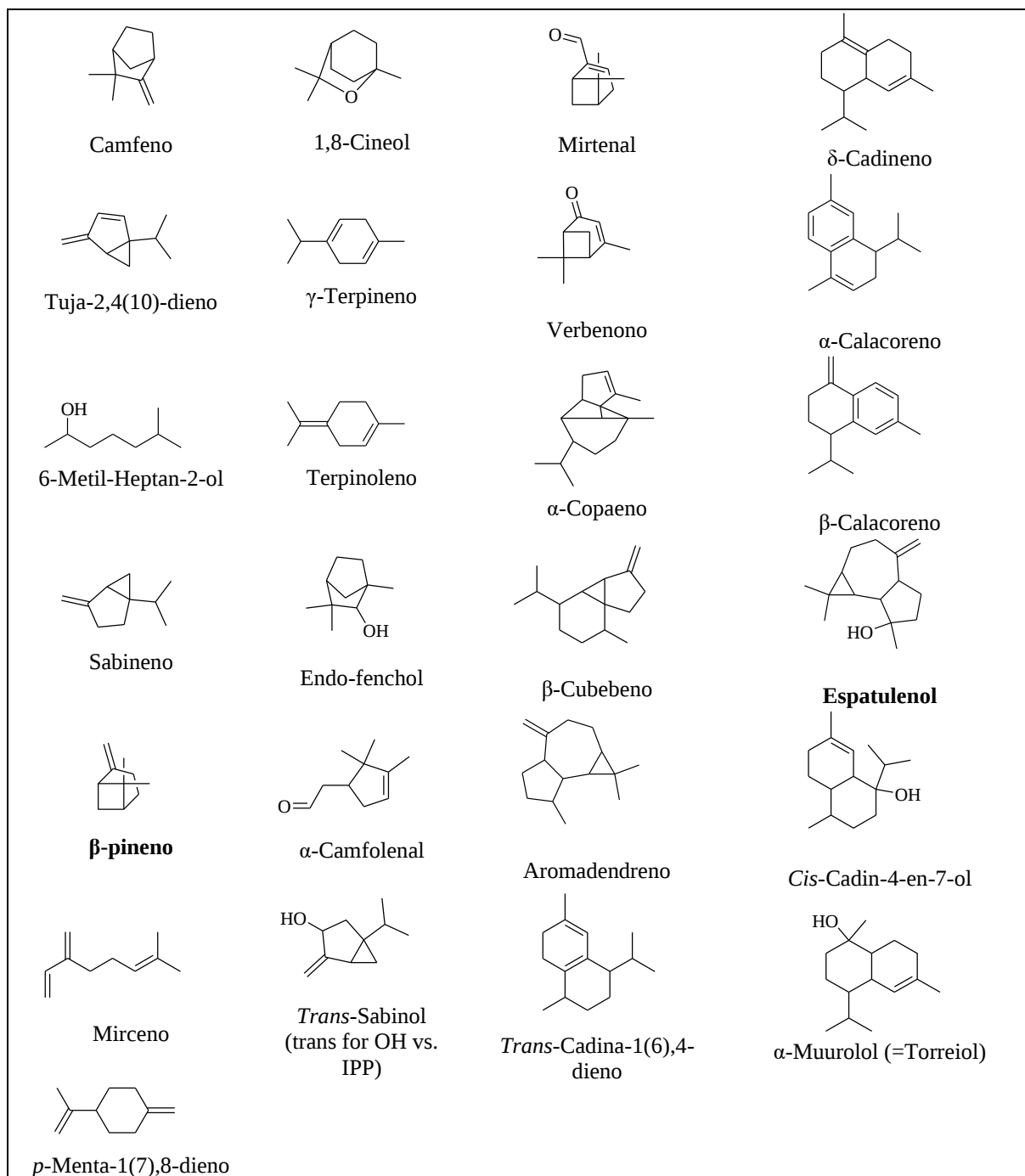
25	Criptono	15.110	1183 ¹	1192	0,06
26	Mirtenal	15.250	1195 ¹	1200	3,00
27	Verbenono	15.440	1204 ¹	1213	0,03
28	α -Copaeno	17.905	1374 ¹	1384	0,37
29	β -Cubebene	18.060	1387 ¹	1395	0,06
30	Aromadendreno	18.525	1439 ¹	1431	2,19
31	<i>Trans</i> -Cadina-1(6),4-dieno	19.175	1475 ¹	1481	0,02
32	γ -Muuroleno	19.210	1478 ¹	1483	0,15
33	<i>Trans</i> -Muurolo-4(14),5-dieno	19.315	1493 ¹	1492	0,55
34	Biciclogermacreno	19.500	1500 ¹	1506	2,25
35	β -Bisaboleno	19.590	1505 ¹	1513	0,19
36	δ -Cadineno	19.740	1522 ¹	1526	1,77
37	α -Calacoreno	20.050	1544 ¹	1551	0,60
38	β -Calacoreno	20.305	1564 ¹	1572	0,12
39	Espatulenol	20.510	1577 ¹	1589	6,68
40	<i>Cis</i> -Cadin-4-en-7-ol	21.100	1635 ¹	1639	0,13
41	α -Muurolol (=Torreiol)	21.275	1644 ¹	1654	0,22
Monoterpenos hidrocarbonetos					71,82
Sesquiterpenos hidrocarbonetos					8,27
Sesquiterpenos oxigenados					7,03
Monoterpenos oxigenados					6,25
Outros					3,03
Total Identificado					96,4

Fonte: Autora (2024).

Nota: ¹[ADAMS, 2007]; ²[(LIAS *et al.*, 2022)]; IR_(C): Índice de Retenção Calculado (coluna Rxi-5ms); IR_(L): Índice de Retenção da Literatura; TR: Tempo de retenção. Negrito indica os principais constituintes.

Figura 9 - Estruturas químicas dos compostos identificados no óleo essencial (OE-DU) extraído das folhas de *Duquetia stelechantha*.





Fonte: Autora (2024).

Negrito indica os principais constituintes.

As folhas de *D. stelechantha* (OE-DU) apresentaram um alto teor de óleo (1,37%), quando comparadas às folhas de outras espécies do gênero *Duguetia* também encontradas no Brasil, como *D. furfuracea* (A. St. Hil.) Saff. (0,8%), *D. lanceolata* St. Hil. (0,3%) e *D. gardneriana* Mart. (0,13%) dos estados de Minas Gerais, São Paulo e Sergipe, respectivamente (RODRIGUES *et al.*, 2015; MAIA *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2020). Na literatura também constam rendimentos acima dos verificados para *D. stelechantha*. Cascaes *et al.* (2022) determinaram 1,76% para OE das folhas de *D. echinophora*.

O OE-DU é composto predominantemente de hidrocarbonetos monoterpênicos (71,82%), seguido por hidrocarbonetos sesquiterpênicos (8,27%), sesquiterpenos oxigenados (7,03%) e pequenos teores de monoterpênicos oxigenados (6,25%). Os componentes majoritários do OE-DU foram β -pineno (46,17%), α -pineno (20,2%) e espatulenol (6,68%).

As classes de compostos mono- e sesquiterpenos foram relatadas em perfis químicos de OEs de várias espécies do gênero *Duguetia* encontradas no Brasil. Dessas classes, os constituintes mais frequentes e considerados marcadores quimiofenéticos de espécies de *Duguetia* são: germacreno D, biciclogermacreno, espatulenol, óxido de cariofileno, epóxido de humuleno II, viridifloreno, β -pineno, α -pineno e β -cariofileno (SANTOS *et al.*, 2022). Esses compostos estão presentes além do gênero *Duguetia*, em outros gêneros da família Annonaceae, como *Annona*, *Anaxagorea*, *Fusae*, *Xylopia*, *Guatteria*, *Hexalobus* e *Pachypodanthium* (ZIDORN, 2019).

Os compostos majoritários do OE-DU também foram relatados em outras espécies de *Duguetia*. α -pineno foi nomeado principal constituinte do OE extraído das folhas e caules finos de *D. trunciflora* e β -pineno presente em menores concentrações nessa mesma amostra (MAIA *et al.*, 2006). Esses compostos também estão entre os mais abundantes no OE das folhas extraído de *D. gardneriana* (ALMEIDA *et al.*, 2010), *D. moricandiana* (ALMEIDA *et al.*, 2010) e *D. riparia* (MAIA *et al.*, 2006), e presentes em quantidades menores em flores de *D. asterotricha* (JÜRGENS *et al.*, 2000) e caules de *D. riparia* (MAIA *et al.*, 2006).

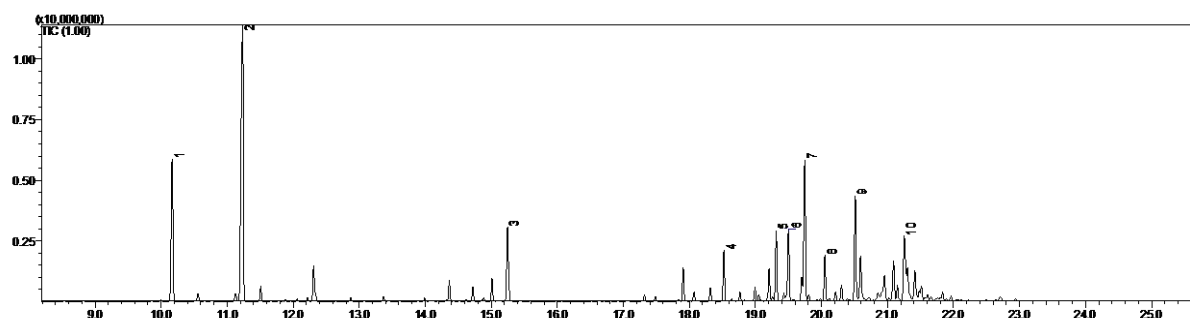
Comparado ao α -pineno e β -pineno, espatulenol está presente em menores teores no OE-DU, o que ocorre de forma semelhante nos OEs obtidos das folhas e caules finos de *D. eximia* (MAIA *et al.*, 2006), da casca de *D. flagellaris* (MAIA *et al.*, 2006), das folhas de *D. glabriúscula* (SIQUEIRA *et al.*, 2003) e casca de *D. furfuracea* (SILVA *et al.*, 2007). No entanto, o espatulenol foi relatado como um constituinte significativo em OEs extraídos das folhas e caules finos de *D. flagellaris*, *D. pycnastera* e *D. riparia* (MAIA *et al.*, 2006), e das folhas de *D. furfuracea* (VIDOTTO *et al.*, 2013). Espatulenol, juntamente com biciclogermacreno aparecem em destaque no perfil químico das folhas de *D. furfuraceae* (MAIA *et al.*, 2020).

Outros compostos são definidos como predominantes nas folhas do gênero *Duguetia*, como: α -selineno, aristoloqueno, (E)-calameneno, e (E)-cariofileno presentes em *D. lanceolata*, coletada em Minas Gerais (Brasil) (MAIA *et al.*, 2020). β -bisaboleno e elemicina identificados em *D. gardneriana*, coletada em Sergipe (Brasil) (RODRIGUES *et al.*, 2015). Essas variações entre os majoritários e a identificação de novos constituintes das espécies de *Duguetia* podem estar associados a diversos fatores, como clima, localização geográfica, características do solo e estação do ano (COSTA *et al.*, 2022).

A caracterização química do OE extraído das cascas de *D. stelechantha* (OE-DU-CAS) identificou 23 compostos por GC-MS, o que representa cerca de 88,1% da composição total do óleo (Figura 10, Figura 11 e Tabela 2).

O composto majoritário do OE-DU, α -pineno, manteve-se em alto teor (26,6%) no OE-DU-CAS, seguido de sibireno (12,05%) e α -tujeno (8,37%), que foi identificado em baixas concentrações (0,03%) no OE-DU.

Figura 10 - Cromatograma GC-MS do óleo essencial extraído das cascas (OE-DU-CAS) de *Duquetia stelechantha*.



Fonte: Autora (2024).

Tabela 2 - Composição volátil do óleo essencial extraído das cascas (OE-DU-CAS) de *Duquetia stelechantha*.

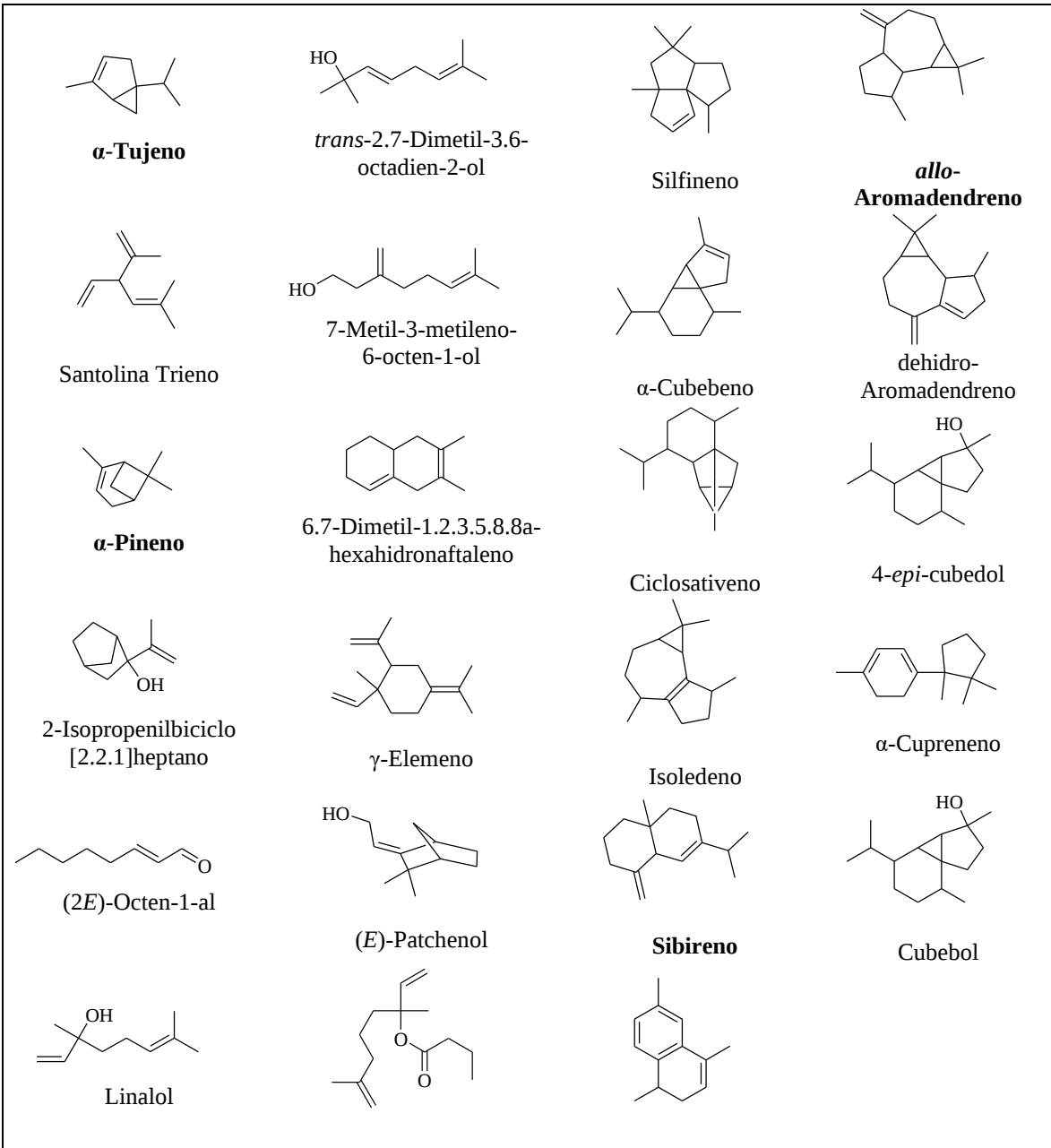
	Constituintes (%)	IR _(L)	IR _(C)	OE-DU-CAS %
1	α-Tujeno	902²	894	8,37
2	Santolina Trieno	906 ¹	903	0,13
3	α-Pineno	932¹	926	26,6
4	2-Isopropenilbíciclo[2.2.1]heptano	969 ²	963	1,05
5	(2E)-Octen-1-al	1049 ¹	1056	1,22
6	Linalol	1095 ¹	1088	0,62
7	trans-2,7-Dimetil-3,6-octadien-2-ol	1100 ²	1101	4,15
8	7-Metil-3-metileno-6-octen-1-ol	1210 ²	1200	0,09
9	6,7-Dimetil-1,2,3,5,8,8a-hexahidronaftaleno	1273 ²	1264	0,83
10	γ -Elemeno	1281 ²	1274	0,20
11	(E)-Patchenol	1328 ¹	1322	0,30
12	Propanoato de Linalol	1334 ¹	1339	0,29
13	Silfineno	1343 ¹	1343	0,10
14	α -Cubebeno	1345 ¹	1354	1,39
15	Ciclosativeno	1369 ¹	1362	0,82
16	Isoledeno	1374 ¹	1375	3,97
17	Sibireno	1400¹	1408	12,05
18	1,4,6-Trimetil-1,2-dihidronaftaleno	1412 ²	1416	4,02
19	allo-Aromadendreno	1458¹	1452	8,16
20	Dehidro-Aromadendreno	1460 ¹	1458	3,87
21	4-epi-cubedol	1484 ²	1477	0,15
22	α -Cupreneno	1496 ¹	1496	1,65

23	Cubebol	1514 ¹	1508	8,07
	Monoterpenos hidrocarbonetos			36,15
	Monoterpenos oxigenados			5,15
	Sesquiterpenos hidrocarbonetos			32,21
	Sesquiterpenos oxigenados			8,22
	Outros			6,37
	Total Identificado			88,1

Fonte: Autora (2024).

Nota: ¹[ADAMS, 2007]; ²[(LIAS *et al.*, 2022)]; IR_(C): Índice de Retenção Calculado (coluna Rxi-5ms); IR_(L): Índice de Retenção da Literatura.
Negrito indica os principais constituintes.

Figura 11 - Estruturas químicas dos compostos do óleo essencial extraído das cascas (OE-DU-CAS) de *Duguetia stelechantha*.



Propanoato de Linalol	1.4.6-Trimetil-1.2-dihidronaftaleno
-----------------------	-------------------------------------

Fonte: Autora (2024).

Negrito indica os principais constituintes.

Como comentado anteriormente, a presença do α -pineno corrobora com descrições anteriores dos constituintes químicos das espécies *Duguetia*. Já o α -tujeno foi identificado entre os componentes majoritários do OE extraído das partes aéreas de *D. quitarensis* (BAY *et al.*, 2019). O relato do composto sibireno nos OEs de espécies de *Duguetia* não é comum. No entanto, é importante observar que a composição química dos OEs pode mudar devido a uma variedade de fatores, como clima, localização geográfica, características do solo e nível de fertilização e estação do ano (COSTA *et al.*, 2022).

O rendimento do OE extraído das cascas do vegetal (OE-DU-CAS) apresentou rendimento inferior, de 0,33%, ao óleo obtido das folhas, 1,37%. O baixo rendimento de OEs extraídos dessa parte de vegetais também foi observado em outras espécies de *Duguetia*. Por exemplo, as cascas de *D. flagellaris* e *D. trunciflora* renderam 0,1%, *D. Lanceolata* teve 0,058% de OE. Mas vale ressaltar que na literatura também consta espécies deste gênero com rendimentos elevados, como o OE das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuraceae* (MAIA *et al.*, 2006; ROSETTI, 2021; SILVA *et al.*, 2005).

Pelo baixo rendimento de OE-DU-CAS, o OE extraído das cascas da planta não foi aproveitado para as etapas seguintes desta pesquisa, utilizou-se para a microemulsão somente o OE obtido das folhas (OE-DU), formulando a ME-DU, caracterizada a seguir.

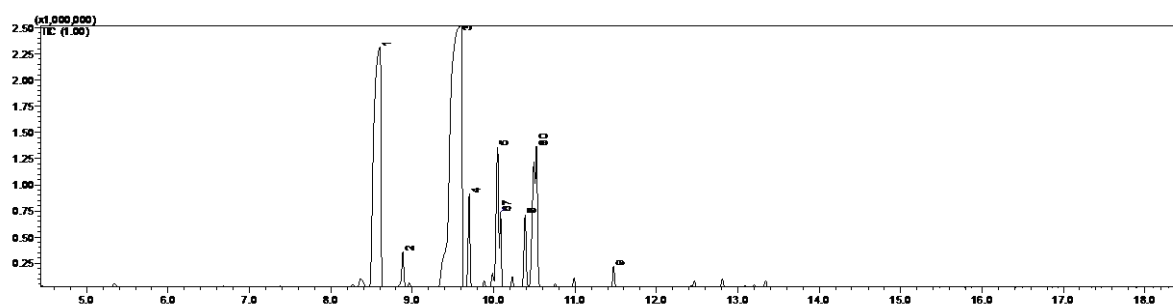
A ME-DU foi analisada por GC/MS-headspace, que identificou 29 componentes, representando 99,68% da composição total da microemulsão (Figura 12, Figura 13 e Tabela 3). A classe de compostos mais representativa da ME-DU, assim como do OE-DU, foi a de hidrocarbonetos monoterpênicos (98,64%). Seguidos por monoterpênicos oxigenados (0,78%) e hidrocarbonetos sesquiterpênicos (0,02%) na ME-DU.

Os compostos em maiores quantidades detectados na análise de GC/MS-headspace da ME-DU foram β -pineno (46,86%), α -pineno (25,5%) e limoneno (5,74%) (Tabela 3). Esses compostos também foram identificados no óleo (OE-DU) incorporado na microemulsão. β -Pineno e α -pineno apresentaram maiores teores tanto no OE-DU quanto na ME-DU. Compostos correspondentes a 88,45% da composição total da microemulsão também estão presentes no óleo que foi adicionado à formulação. A presença dessas substâncias na microemulsão indica

que o OE-DU foi incorporado à formulação da ME-DU, como esperado, e que os princípios ativos da amostra de OE-DU foram preservados, potencializando a atividade biológica.

Alguns componentes identificados na análise de GC/MS-headspace da ME-DU não foram identificados nas avaliações do OE-DU. Esses componentes são relatados na literatura como uma parte do perfil químico de OEs de espécies de *Duguetia* que ocorrem no Brasil, a exemplo de α -felandreno e terpinen-4-ol, relatados para o OE obtido das folhas de *D. furfuracea*, p-Cymene detectado no OE extraído das flores de *D. asterotricha* e folhas de *D. furfuracea* e (E)-cariofileno obtido do OE extraído das folhas e caules de *D. furfuracea* e das partes aéreas de *D. quitarensis*, entre outros (SANTOS *et al.*, 2022).

Figura 12 - Cromatograma GC/MS-headspace da microemulsão (ME-DU) do óleo essencial obtido das folhas de *Duguetia stelechantha*.



Fonte: Autora (2024).

Tabela 3 - Caracterização da microemulsão obtida do óleo essencial de *Duguetia stelechantha* (ME-DU) pelo método GC/MS-headspace.

Perfil Volátil			Abundância, fragmentação e íon molecular		
	Composto	TR	Área (%)	IM	Fragmentos (%)
1	Tolueno	4.445	0,05	92 (M ⁺)	91 (100); 92 (63); 40 (56)
2	Hexanal	5.340	0,13	98 (M ⁺)	56 (100); 44 (77); 57 (62)
3	2-Hexenal	6.685	0,03	98 (M ⁺)	55 (100); 41 (78); 69 (61)
4	Triciclono	8.270	0,09	136 (M ⁺)	93 (100); 92 (25) 91 (27)
5	α -Tujeno	8.365	0,51	136 (M ⁺)	93 (100); 91 (55); 92 (37)
6	α-Pino	8.605	25,5	136 (M ⁺)	93 (100); 92 (41); 91 (40)
7	Camfeno	8.885	1,21	136 (M ⁺)	93 (100); 121 (73); 79 (36)
8	Tuja-2,4(10)-dieno	8.960	0,13	134 (M ⁺)	91 (100); 92 (48); 119 (19)
9	β-Pino	9.600	46,86	136 (M ⁺)	93 (100); 69 (40); 41 (39)
10	Mirceno	9.700	2,76	136 (M ⁺)	93 (100); 41 (73); 69 (70)
11	<i>p</i> -menta-1(7),8-dieno	9.985	0,45	136 (M ⁺)	93 (100); 79 (40); 91 (22)
12	α -Felandreno	10.050	5,67	136 (M ⁺)	93 (100); 91 (49); 77 (34)
13	δ -3-Careno	10.085	1,74	136 (M ⁺)	93 (100); 91 (42); 92 (29)
14	α -Terpineno	10.230	0,28	136 (M ⁺)	121(100); 93 (85); 91 (42) 119 (100); 134 (29); 91
15	<i>p</i> -Cimeno	10.385	2,54	134 (M ⁺)	(26)
16	Limoneno	10.495	5,74	136 (M ⁺)	93 (100); 68 (96); 67 (66)

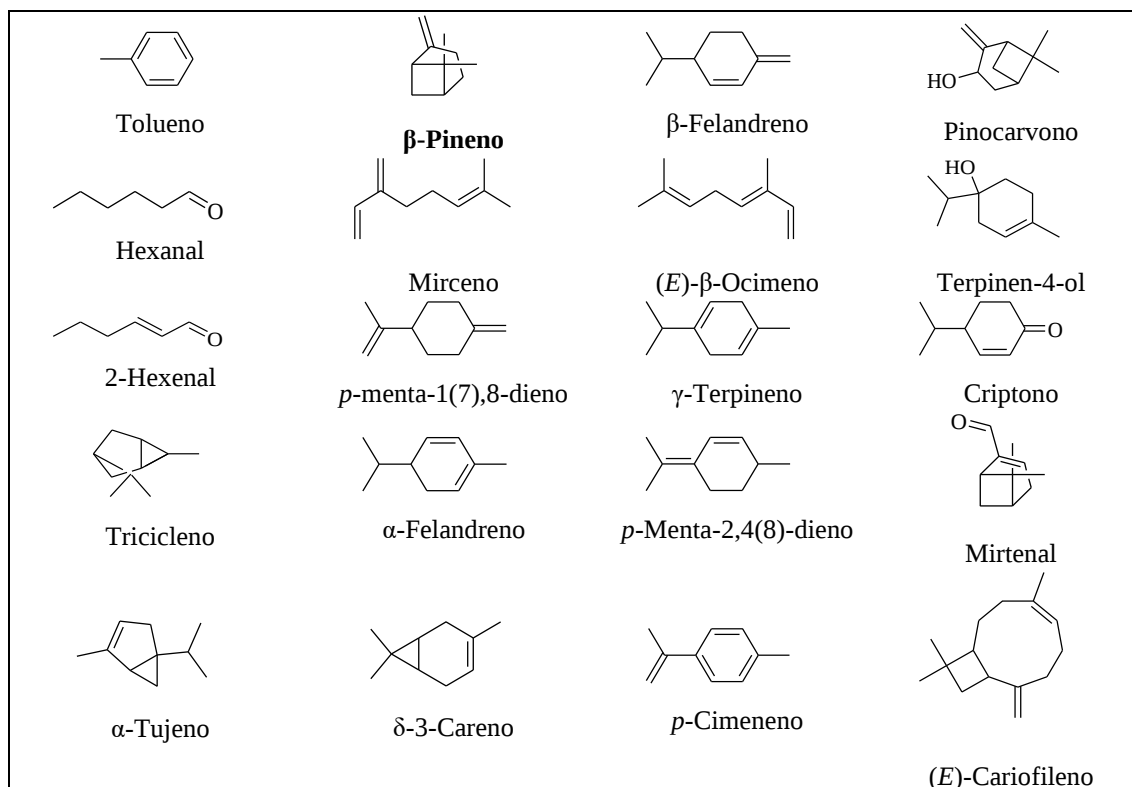
17	β -Felandreno	10.525	4,21	136 (M ⁺)	93 (100); 91 (36); 77 (33)
18	(E)- β -Ocimeno	10.755	0,08	136 (M ⁺)	93 (100); 91 (48); 80 (42)
19	γ -Terpineno	10.990	0,26	136 (M ⁺)	93 (100); 91 (50); 121 (30)
20	<i>p</i> -Menta-2,4(8)-dieno	11.475	0,58	136 (M ⁺)	93 (100); 121 (93); 136 (64)
21	<i>p</i> -Cimeneno	11.555	0,01	132 (M ⁺)	117 (100); 132 (84); 115 (49)
22	Perileno	11.680	0,02	150 (M ⁺)	69 (100); 81 (75); 41 (63)
23	Nopinono	12.425	0,03	138 (M ⁺)	83 (100); 55 (60); 81 (36)
24	<i>Trans</i> -Pinocarveol	12.465	0,19	152 (M ⁺)	92 (100); 55 (99); 91 (65)
25	Pinocarvono	12.810	0,24	150 (M ⁺)	53 (100); 81 (90); 108 (69)
26	Terpinen-4-ol	13.095	0,05	154 (M ⁺)	71 (100); 111 (56); 93 (54)
27	Criptono	13.200	0,07	138 (M ⁺)	71 (100); 111 (56); 93 (54)
28	Mirtenal	13.340	0,23	150 (M ⁺)	79 (100); 107 (53); 91 (38)
29	(E)-Cariofileno	16.610	0,02	204 (M ⁺)	93 (100); 133 (85); 91 (83)
Monoterpenos hidrocarbonetos				98,64	
Monoterpenos oxigenados				0,78	
Sesquiterpenos hidrocarbonetos				0,02	
Outros				0,24	
Total Identificado				99,68	

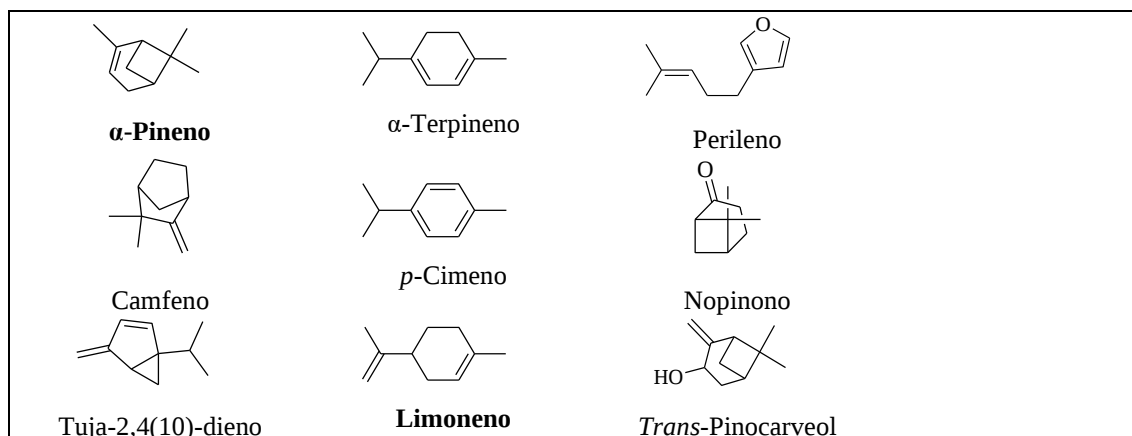
Fonte: Autora (2024).

Nota: TR = Tempo de retenção. IM = Íon molecular.

Negrito indica os principais constituintes.

Figura 13 - Estruturas químicas dos compostos da microemulsão obtida do óleo essencial de *Duguetia stelechantha* (ME-DU) pelo método GC/MS-headspace.





Fonte: Autora (2024).

Negrito indica os principais constituintes.

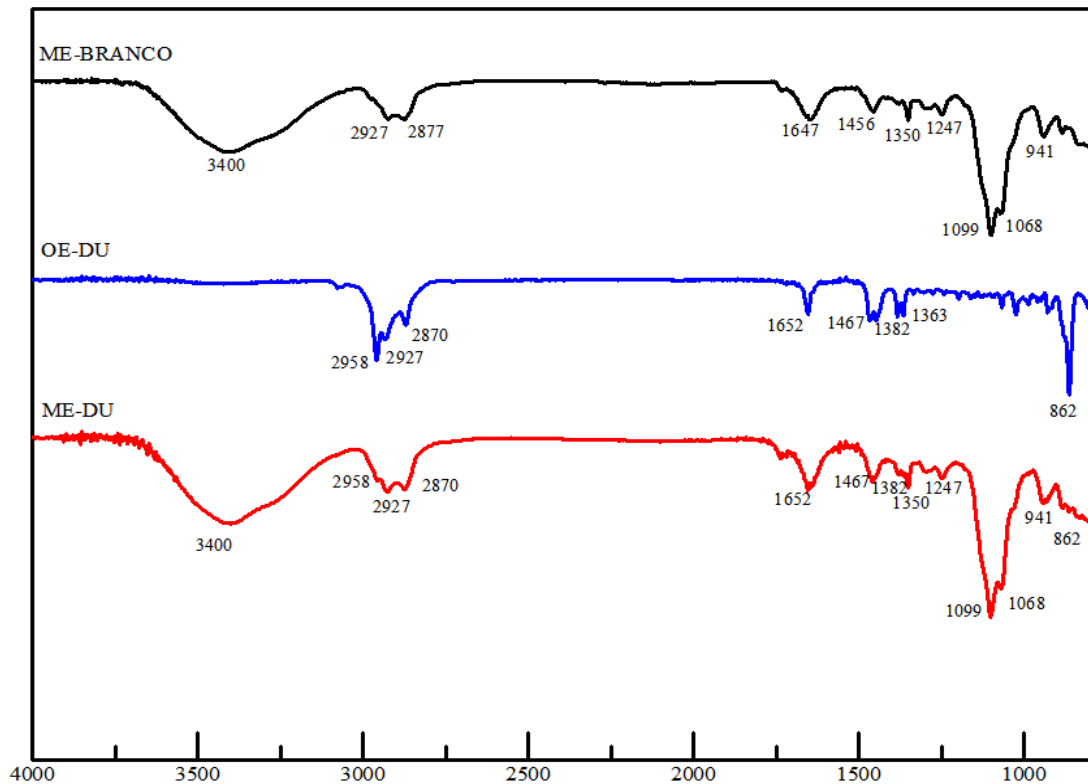
O OE-DU e a ME-DU também foram caracterizados por infravermelho. Pelos resultados obtidos no OE-DU (Figura 14), observou-se bandas nas frequências de 2.958 cm^{-1} , 2.927 cm^{-1} e 2.870 cm^{-1} , que de acordo com Donald *et al.* (2010) e Lopes e Fascio (2004), podem ser atribuídos a estiramento C-H (alifático). Na frequência 1.652 cm^{-1} observou-se uma banda característica de estiramento C=C (alceno). Em 1.467 cm^{-1} ocorre deformação angular -CH₂-, na região de 1.382 cm^{-1} estiramento C-O e a banda 862 cm^{-1} , que representa deformação de anel aromático. Todas essas regiões identificadas em OE-DU apresentam-se na ME-DU, o que comprova a incorporação do óleo no sistema microemulsionado.

A banda 1.363 cm^{-1} , que representa um estiramento C-O, está presente no OE-DU, no entanto, não aparece na ME-DU, o que pode ser devido à sobreposição das bandas no espectro. Situação que costuma ocorrer pois algumas vibrações têm mesma frequência e por essa razão ocorre a sobreposição de bandas de absorção.

No espectro da formulação ME-DU foram visualizadas ainda bandas presentes no espectro dos tensoativos, como em 3.400 cm^{-1} , que de acordo com Donald *et al.* (2010) corresponde à deformação larga O-H; em 1.350 cm^{-1} e 1.247 cm^{-1} , um estiramento C-O; a faixa de 1.099 a 1.068 cm^{-1} é relativa ao estiramento forte C-O, característico de grupos de estéres e éteres; e a frequência de 941 cm^{-1} atribuída à deformação angular C-H (Figura 14).

Com base nos resultados obtidos, infere-se que a observação de bandas iguais na formulação ME-DU e no ME-BRANCO, representa ausência de interação ou reação química entre os constituintes do OE-DU incorporados na ME-DU e os tensoativos presentes na formulação. Tal constatação significa que o ME-BRANCO é considerado apropriado para transportar e entregar os princípios ativos do OE sem modificar suas estruturas e nem interferir negativamente em suas atividades biológicas.

Figura 14 - Espectros obtidos na região do Infravermelho para o óleo essencial (OE-DU) e a microemulsão (ME-DU) de *Duguetia stelechantha*, e seu branco (ME-BRANCO).

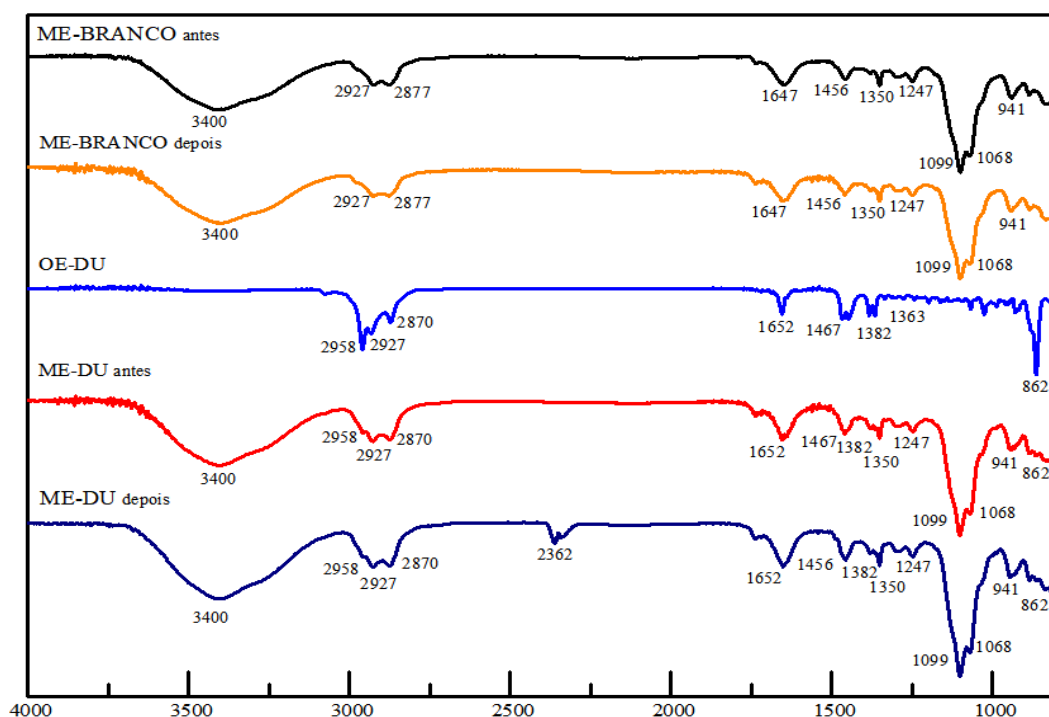


Fonte: Autora (2024).

A caracterização por infravermelho ocorreu antes e após o teste de estabilidade térmica da ME, a fim de investigar se houve alteração na composição química do sistema microemulsionado após a variação de temperatura.

Na análise realizada depois do teste de estabilidade térmica, todas as bandas do espectro dos tensoativos (ME-BRANCO) são mantidas, significando que a variação de temperatura não ocasionou alteração da formulação do veículo da ME (Figura 15).

Figura 15 - Espectro obtidos na região do Infravermelho para o óleo essencial (OE-DU) e a microemulsão (ME-DU) de *Duguetia stelechantha*, e seu branco (ME-BRANCO) antes e após o teste de estabilidade térmica da microemulsão.



Fonte: Autora (2024).

Da mesma forma, na ME-DU após o teste de estabilidade térmica todas as bandas do espectro são mantidas, com exceção da banda com frequência de 1.467 cm^{-1} , que representa deformação angular $-\text{CH}_2-$, segundo Donald *et al.* (2010) e Lopes e Fascio (2004), que não apareceu na ME após a variação de temperatura, entretanto, foi identificada uma banda em uma região próxima a esta, em 1.456 cm^{-1} (Figura 15). A região dessas bandas apresenta vários sinais próximos, que podem ter ocasionado a sobreposição das bandas e interferindo na identificação destas frequências no espectro. E na ME após a variação da temperatura identificou-se uma banda adicional, não visualizada anteriormente, na região de 2.362 cm^{-1} , que pode ser atribuída ao estiramento C-H (alifático). Os demais resultados obtidos no teste de estabilidade térmica da ME estão expostos na seção 4.4.1.

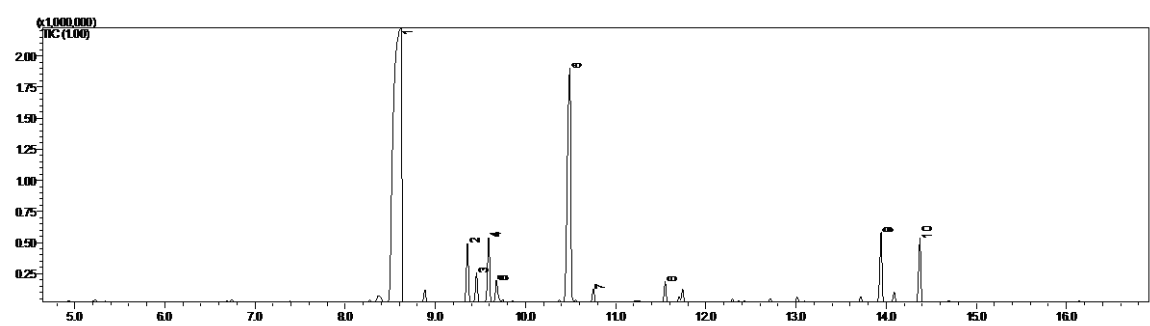
4.1.2 Caracterização química do óleo essencial e da microemulsão de *Pectis brevipedunculata*

O rendimento de OE-PB extraído de 300 g das partes aéreas de *P. brevipedunculata* foi 0,67%, superior ao observado para o óleo desta espécie extraído das folhas, galhos, flores e sementes relatado em outro estudo que foi de 0,17% (LEAL, 2010), bem como o OE obtido das folhas e porções florais, de 0,36% (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Um estudo sazonal do OE extraído

de *P. brevipedunculata* relatou maiores teores de rendimento nos meses de janeiro e maio (2,1%) e menores teores em fevereiro e setembro (1,1%) (CAMARA *et al.*, 2023).

A composição volátil do óleo essencial (OE-PB) extraído de *P. brevipedunculata* está presente na Figura 16, Figura 17 e Tabela 4. Foram identificados 27 compostos pelo método GC/MS, compreendendo cerca de 99,6% da composição total do óleo. As classes de compostos mais identificados foram a dos monoterpenos oxigenados (66,1%) e monoterpenos hidrocarbonetos (28,4%). Os compostos majoritários do OE-PB foram geranial (29,9%), neral (24,0%), seguidos do α -pineno (17,9%) e limoneno (9,0%) (Tabela 4).

Figura 16 - Cromatograma GC-MS do óleo essencial extraído de *Pectis brevipedunculata* (OE-PB).



Fonte: Autora (2024).

Tabela 4 - Caracterização do óleo essencial (OE-PB) extraído de *Pectis brevipedunculata* por GC/MS.

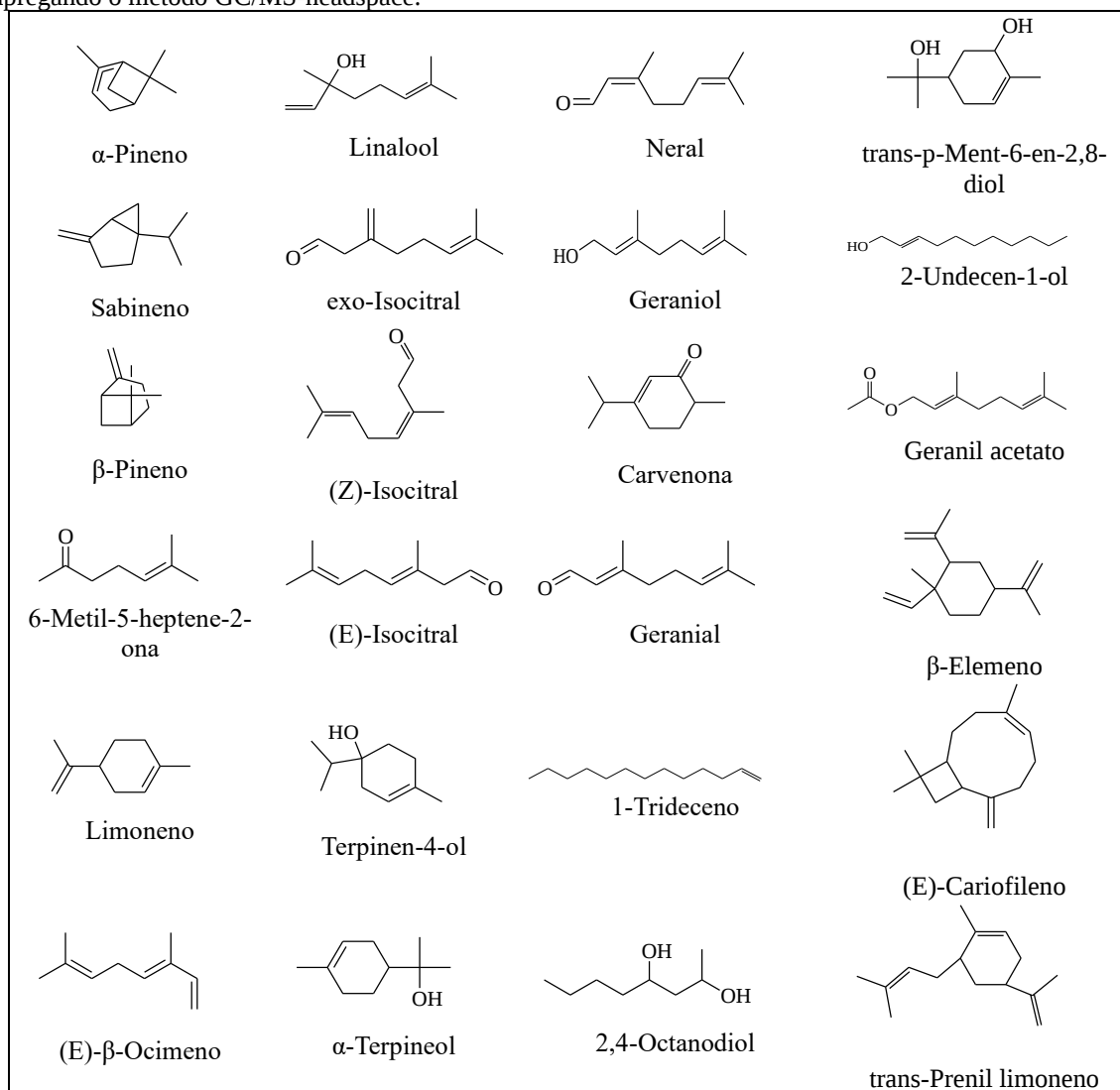
	Constituintes	IR _(C)	IR _(L)	%
1	α-Pineno	935	924^a	17,9
2	Sabineno	935	932 ^a	0,8
3	β -Pineno	975	969 ^a	0,4
4	6-Metil-5-hepten-2-ona	979	974 ^a	1,5
5	Limoneno	988	986^c	9,0
6	(E)- β -Ocimeno	1032	1024 ^a	0,3
7	3-Metil-1,2-ciclohexanodiona	1050	1046 ^a	0,4
8	Linalool	1094	1089 ^a	1,5
9	exo-Isocitral	1102	1095 ^a	0,3
10	(Z)-Isocitral	1147	1140 ^c	0,8
11	(E)-Isocitral	1165	1160 ^a	1,3
12	Terpinen-4-ol	1183	1177 ^a	0,3
13	α -Terpineol	1186	1180 ^a	0,4
14	Nerol	1200	1195 ^c	1,7
15	Neral	1228	1227^a	24,0
16	Geraniol	1244	1235 ^a	4,4
17	Carvenona	1253	1249 ^a	0,3
18	Geranial	1261	1255^a	29,9
19	1-Trideceno	1273	1264 ^a	0,3
20	2,4-Octanodiol	1295	1290 ^a	0,5
21	trans-p-Ment-6-en-2,8-diol	1339	1339 ^a	0,8

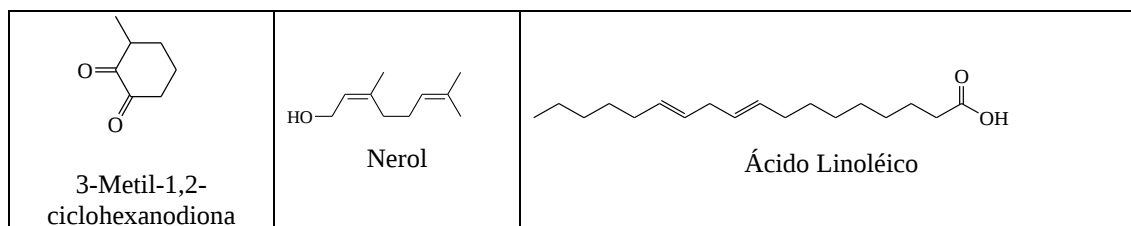
22	2-Undecen-1-ol	1369	1371 ^a	0,8
23	Geranil acetato	1374	1370 ^c	0,4
24	β -Elemeno	1379	1379 ^a	0,5
25	(E)-Cariofileno	1396	1389 ^a	0,4
26	trans-Prenil limoneno	1430	1424 ^c	0,4
27	Ácido Linoléico	2133	2132 ^a	0,3
Monoterpenos hidrocarbonetos				28,4
Monoterpenos oxigenados				66,1
Sesquiterpenos hidrocarbonetos				1,3
Ácidos graxos e derivados				3,8
Total identificado				99,6

Fonte: Adaptado de CAMARA et al. (2023).

Nota: ^a [RAPOSO et al., 2018]; ^c [MONDELLO, 2011]; IR_(C): Índice de Retenção Calculado (coluna Durabond-5ms); IR_(L): Índice de Retenção da Literatura. Negrito indica os principais constituintes.

Figura 17 - Estruturas químicas dos compostos do óleo essencial (OE-PB) extraído de *Pectis brevipedunculata* empregando o método GC/MS-headspace.



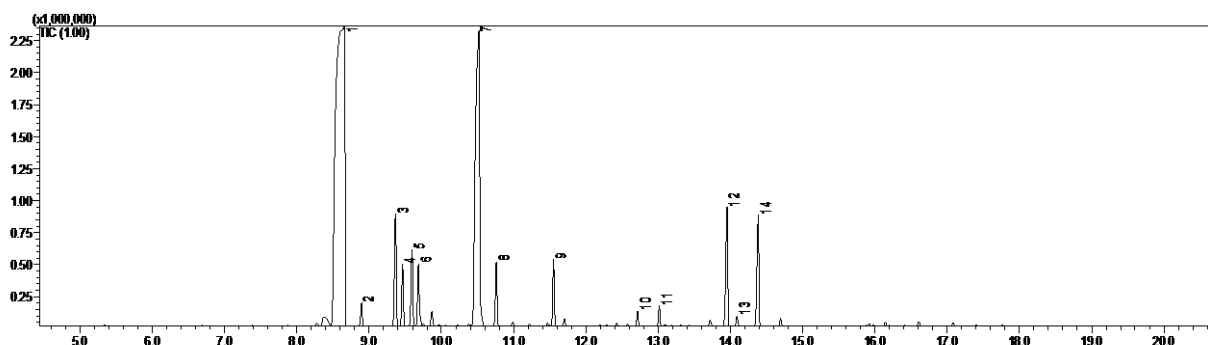


Fonte: Autora (2024).

Negrito indica os principais constituintes.

A composição volátil da microemulsão (ME-PB) formulada com o óleo essencial (OE-PB) extraído de *P. brevipedunculata* está exposta na Figura 18, Figura 19 e Tabela 5. Foram identificados 25 compostos pelo método GC/MS-headspace, compreendendo cerca de 98,61% da composição total da microemulsão. As classes de compostos mais identificados foram a dos hidrocarbonetos monoterpênicos (84,64%) e monoterpênicos oxigenados (8,93%). Os compostos majoritários da ME-PB foram o α -pineno (50,17%) e o limoneno (23,17%), seguidos do neral (4,22%) e geranial (3,90%) (Tabela 5). Os resultados mostram que os compostos majoritários do OE-PB também estão entre os compostos de maiores teores na ME-PB.

Figura 18 - Cromatograma GC/MS-headspace da microemulsão (ME-PB) do óleo essencial (OE-PB) extraído das partes aéreas de *Pectis brevipedunculata*.



Fonte: Autora (2024).

Tabela 5 - Caracterização da microemulsão (ME-PB) formulada com óleo essencial (OE-PB) de *Pectis brevipedunculata* empregando o método GC/MS-headspace.

	TR ^a	IK ^b	Composto	Fórmula	Área (%)
1	8.270	926	Triciclono	C ₁₀ H ₁₆	0,12
2	8.385	930	α -Tujeno	C ₁₀ H ₁₆	0,86
3	8.605	939	α-Pineno	C ₁₀ H ₁₆	50,17
4	8.895	959	Camfeno	C ₁₀ H ₁₆	0,67
5	9.355	975	Sabineno	C ₁₀ H ₁₆	3,74
6	9.460	979	β -Pineno	C ₁₀ H ₁₆	1,87
7	9.595	985	6-Metil-5-heptene-2-ona	C ₈ H ₁₄ O	2,47
8	9.680	990	β -Mirceno	C ₁₀ H ₁₆	2,05
9	9.755	991	6-Metil-5-hepten-2-ol	C ₈ H ₁₆ O	0,05
10	10.520	1029	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	23,17

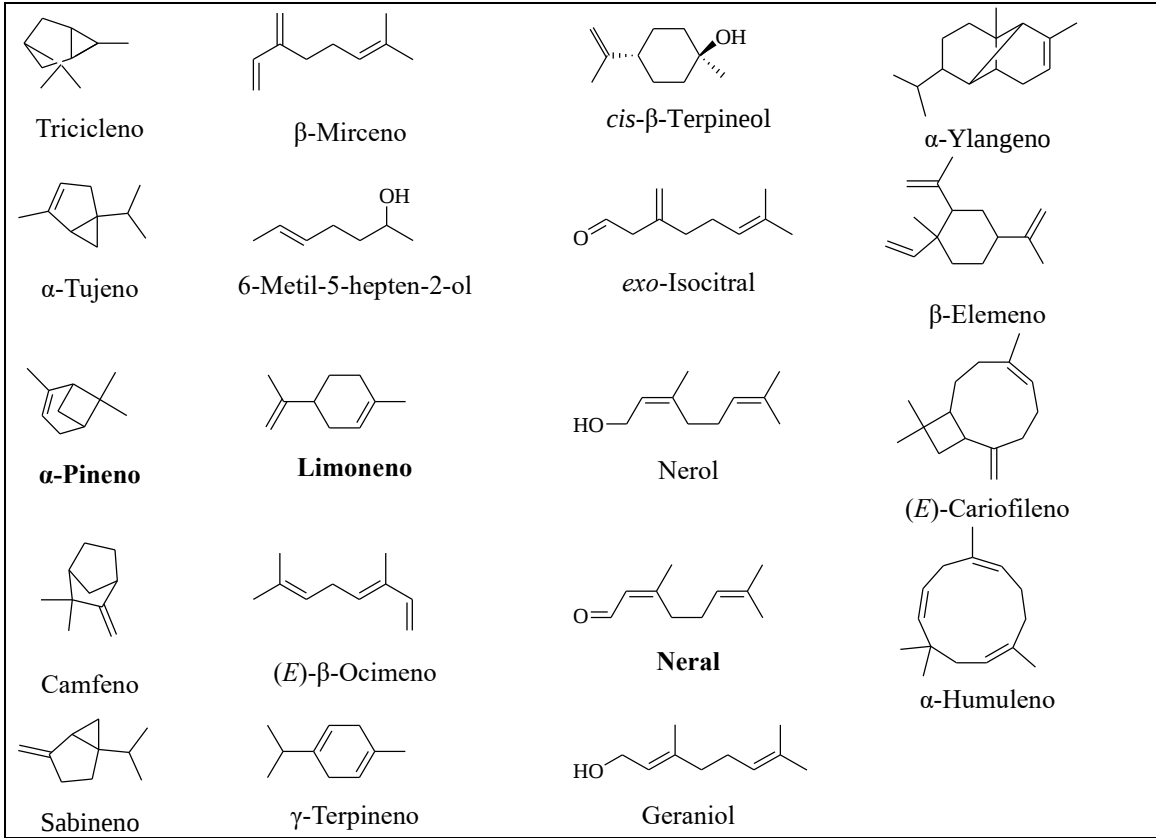
11	10.760	1050	(E)-β-Ocimeno	C ₁₀ H ₁₆	1,84
12	10.985	1059	γ-Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	0,10
13	11.470	1088	p-Menta-2,4(8)-dieno	C ₁₀ H ₁₆	0,08
14	11.550	1370	Etilciclopropano	C ₁₁ H ₂₂	1,94
15	11.705	1140	cis-β-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	0,19
16	12.425	1144	exo-Isocitral	C ₁₀ H ₁₆ O	0,07
17	13.720	1229	Nerol	C ₁₀ H ₁₈ O	0,18
18	13.950	1238	Neral	C ₁₀ H ₁₆ O	4,22
19	14.090	1252	Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	0,29
20	14.385	1267	Geranial	C ₁₀ H ₁₆ O	3,90
21	14.695	1370	n- Undecanol	C ₁₁ H ₂₄ O	0,21
22	15.920	1375	α-Ylangeno	C ₁₅ H ₂₄	0,05
23	16.140	1390	β-Elemeneno	C ₁₅ H ₂₄	0,11
24	16.610	1408	(E)-Cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	0,12
25	17.085	1454	α-Humuleno	C ₁₅ H ₂₄	0,09
Monoterpenos hidrocarbonetos					84,64
Monoterpenos oxigenados					8,93
Sesquiterpenos hidrocarbonetos					0,37
Ácidos graxos e derivados					4,67
Total identificado					98,61

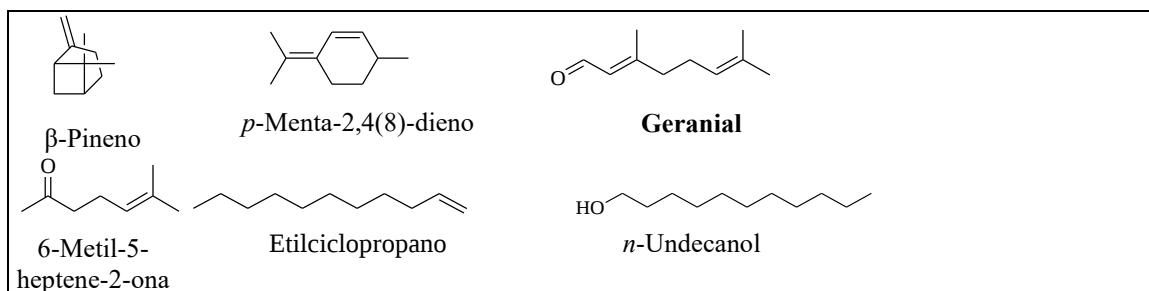
Fonte: Autora (2024).

Nota: ^aTR: Tempo de retenção, ^bIK: Índice de Kovats.

Negrito indica os principais constituintes.

Figura 19 - Estruturas químicas dos compostos da microemulsão (ME-PB) formulada com óleo essencial (OE-PB) de *Pectis brevipedunculata* empregando o método GC/MS-headspace.





Fonte: Autora (2024).

Negrito indica os principais constituintes.

Compostos correspondentes a 52% da composição total da microemulsão também estão presentes no óleo que foi adicionado à formulação. A presença dessas substâncias na formulação indica que o OE-PB foi incorporado ao sistema ME-PB, e que os princípios ativos do OE-PB foram preservados, potencializando a atividade biológica.

Os monoterpenos oxigenados isoméricos neral e geranial constituem o citral. O citral é considerado um marcador químico dos OEs de várias espécies do gênero *Pectis*, como *P. apodocephala*, *P. angustifolia*, *P. brevipedunculata*, *P. ciliares*, *P. elongata*, *P. jangadensis* e *P. linifolia* (MARQUES *et al.*, 2013). A avaliação sazonal e circadiana do OE de *P. brevipedunculata* extraído por hidrodestilação evidencia teores de citral variando entre 49,8 a 76,4%, seguido de α -pineno (7,2 a 19,8%) e limoneno (5,3 a 9,4 %) (CAMARA *et al.*, 2023). As concentrações de citral e o perfil volátil de *P. brevipedunculata* podem sofrer variações dependendo da técnica de extração de OE empregada (MARQUES; KAPLAN, 2013). Marques e Kaplan (2013) demonstraram que a composição volátil do OE de *P. brevipedunculata* extraído por hidrodestilação contém 84,0% de citral, sendo 35,8% de neral e 48,2% de geranial, seguido de limoneno (2,7%) e α -pineno (1,9%), enquanto as partes aéreas da amostra vegetal, que foram caracterizadas pelo método de microextração em fase sólida no modo headspace contém altas porcentagens dos monoterpenos α -pineno (17,3 a 25,5%) e limoneno (10 a 11%), enquanto geranial (2,8 a 10,9%) e neral (2,5 a 6,5%) estão presentes apenas em menores quantidades, como observado no presente trabalho.

Marques e Kaplan (2013) compararam o perfil químico dos voláteis de *P. brevipedunculata* obtido pelo método de microextração em fase sólida no modo headspace, modificando as condições empregadas. Realizaram análises com tipos diferentes de fibras e empregando temperaturas variadas, de 40° e 80°C. Os pesquisadores inferem que as temperaturas empregadas no método headspace, que foram mais baixas que a temperatura de 100°C usada em hidrodestilação, permitiram a detecção em altas porcentagens de monoterpenos muito voláteis, como α -pineno e limoneno. Acrescenta-se que a amostra apresentou um perfil de monoterpene mais elevado quando extraído a 40°C. Os resultados

mostram que temperaturas mais altas podem diminuir a quantidade de determinados compostos na amostra. Os autores compararam ainda os perfis químicos obtidos com as duas fibras utilizadas, a fibra bipolar de 75- μm divinilbenzeno-carboxen (DVB-CAR) e a fibra apolar de 100- μm polidimetilsiloxano (PDMS), os compostos α -pineno e limoneno foram detectados em concentrações superiores a 10%, estando entre os principais terpenos nas frações voláteis. Os autores apontaram ainda que a fibra bipolar DVB-CAR correlaciona-se melhor, apresentando mais afinidade com os componentes presentes em *P. brevipedunculata*, e por esta razão a absorção/dessorção dos componentes do citral (geranial e neral) foi menos eficiente na fibra apolar PDMS (MARQUES; KAPLAN, 2013).

A extração de compostos voláteis, como terpenoides, é afetada por uma variedade de fatores. As variáveis e as condições ótimas do método headspace vem sendo estudadas para otimizar a extração. Yang *et al.* (2020) experimentaram tempos diferentes de dessorção, de equilíbrio, de extração e o efeito da adição de sal na amostra a fim de determinarem a faixa ideal de temperatura de extração. Os efeitos dessas variáveis sobre o rendimento de extração de terpenoides foi investigado e Yang *et al.* (2020) concluíram que a temperatura e o tempo de dessorção da análise podem afetar a transferência de analitos; a temperatura de extração relaciona-se com o tempo de extração e afeta a taxa de extração, pois os coeficientes de partição são dependentes da temperatura, no entanto, o aumento da temperatura de extração não resulta condicionalmente em melhor rendimento e isolamento de compostos voláteis, além de que a elevação da temperatura pode interferir na dessorção de compostos já adsorvidos na fibra; e a adição de sal inorgânico nas amostras acelera a liberação de compostos no headspace, pois aumenta a força iônica e, conseqüentemente, reduz a solubilidade de compostos orgânicos na amostra, promovendo a concentração de analitos e assim otimiza a eficiência e sensibilidade da extração.

Sobre a temperatura de extração, Yang *et al.* (2020) também observaram em experimento que compostos como β -citral, α -citral e eucaliptol têm maiores rendimentos de extração em torno de 40°C, como encontrado por Marques e Kaplan (2013), e a eficiência de extração não se torna melhor em temperaturas mais elevadas.

Tais constatações embasam os resultados dos percentuais de citral encontrados na ME-PB, pois a temperatura utilizada foi superior (85°C) ao citado na literatura, vale ressaltar que a técnica utilizada no experimento em questão foi o headspace dinâmico.

Foi relatado ainda na literatura alterações nos percentuais de citral causados pela modificação de temperatura durante a secagem do material vegetal previamente à extração do OE. Por exemplo, OEs extraídos da planta fresca de *P. brevipedunculata* e da planta seca a

40°C e 60°C apresentaram neral e geranial como constituintes principais, seguido por α -pineno e limoneno. No entanto, baixos teores de geranial foram detectados no OE oriundo de material vegetal seco à temperatura ambiente (29,7°C), com predominância de α -pineno e neral. Isso pode ser devido à volatilização natural durante longos períodos de secagem à temperatura ambiente, gerando perdas e degradação dos constituintes do OE (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

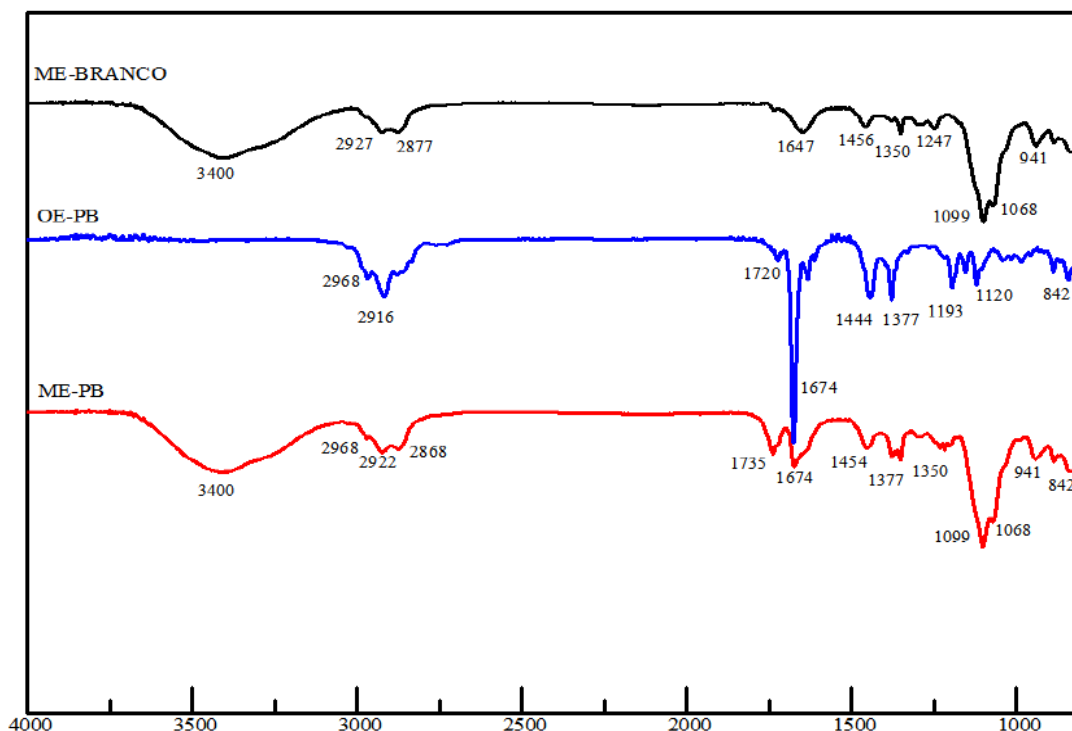
Para minimizar as perdas de princípios ativos presentes nos óleos essenciais e das demais substâncias que podem conferir propriedades organolépticas, como sabor e aroma, a alimentos e bebidas, assim como manter, de forma geral, a qualidade de plantas medicinais depois do processo de secagem e do armazenamento, Oliveira, Berbert e Martinazzo (2013) realizaram estudo para melhorar as etapas envolvidas no pré-processamento dessas plantas. O estudo envolveu as curvas experimentais de secagem da parte aérea de *P. brevipedunculata*, em que utilizaram modelos matemáticos em programas de simulação, que permitiram simular o processo de secagem a 30, 40 e 50°C e encontrar as melhores variáveis. Os pesquisadores identificaram que o modelo exponencial simples de três parâmetros foi o que melhor representou as curvas experimentais de secagem.

O OE-PB e a ME-PB também foram caracterizados por infravermelho (IV). A análise indicou as seguintes bandas presentes no OE-PB: 2.968 cm^{-1} , que representa o estiramento C-H, segundo (DONALD *et al.*, 2010); 1.674 cm^{-1} , que condiz com estiramento C=C; 1.377 cm^{-1} , que corresponde à deformação simétrica média em CH_3 ; e a banda 842 cm^{-1} , que representa deformação de anel aromático. Todas essas regiões identificadas em OE-PB apresentam-se na ME-PB, o que comprova a incorporação do óleo no sistema microemulsionado. Acrescentadas a estas bandas, foram visualizadas ainda regiões similares em 2.916 cm^{-1} e 2.922 cm^{-1} (estiramento C-H); 1.720 cm^{-1} e 1.735 cm^{-1} (estiramento C=O); 1.444 cm^{-1} e 1.454 cm^{-1} (deformação assimétrica CH_3) no OE-PB e na ME-PB, respectivamente (Figura 20).

No óleo essencial foi possível verificar também as bandas 1.193 cm^{-1} e 1.120 cm^{-1} , de estiramento C=O, que possivelmente não estão evidenciadas no espectro da ME em razão da sobreposição das bandas dessa região (Figura 20).

As demais frequências identificadas na ME-PB estão presentes no espectro dos tensoativos (ME-BRANCO), que são: 1.350 cm^{-1} ; 1.099 cm^{-1} ; 1.068 cm^{-1} e 941 cm^{-1} , que representam deformação C-O e deformação angular fora do plano C=C (Figura 20).

Figura 20 - Espectros obtidos na região do Infravermelho para o óleo essencial (OE-PB) e da microemulsão (ME-PB) de *Pectis brevipedunculata*, e seu branco (ME-BRANCO).



Fonte: Autora (2024).

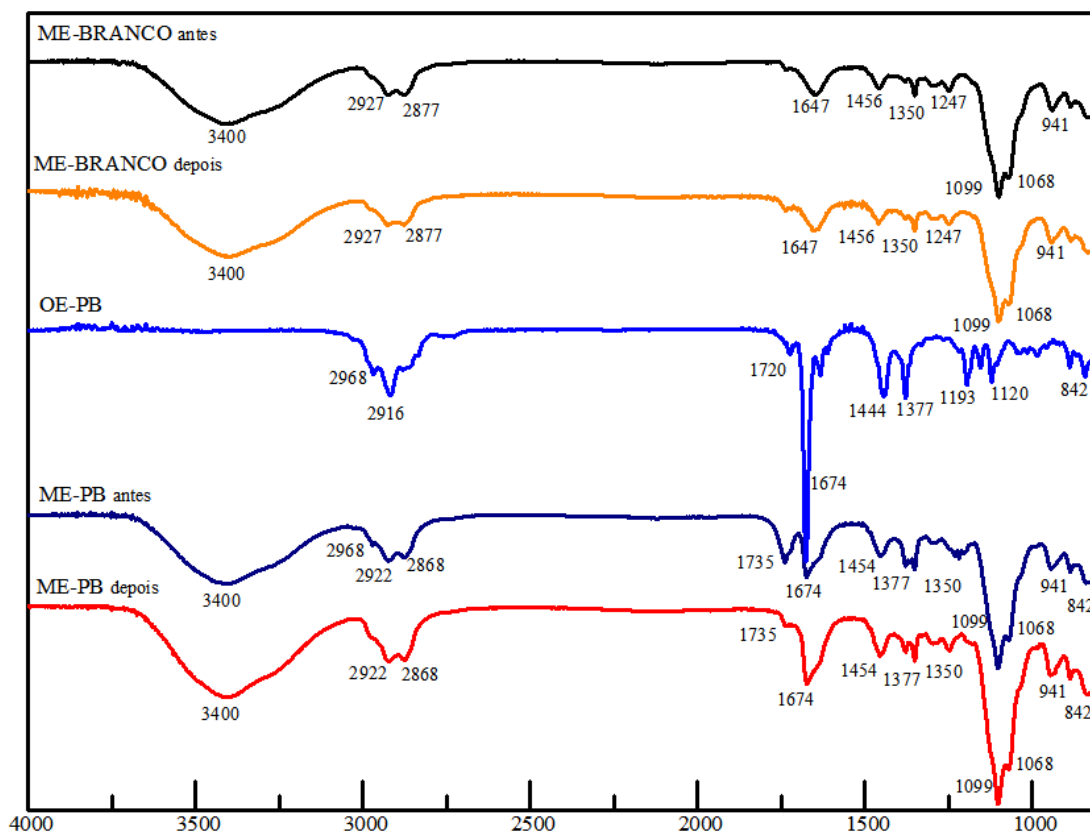
A ME-PB e o ME-BRANCO foram caracterizados por infravermelho antes e após o teste de estabilidade térmica da ME, a fim de investigar se a variação de temperatura ocasionou alteração na composição química da formulação (Figura 21).

Na análise realizada após o teste de estabilidade térmica, todas as bandas do espectro dos tensoativos (ME-BRANCO) foram conservadas, significando que a variação de temperatura não interferiu na composição do veículo da ME (Figura 21).

Da mesma forma, na ME-PB, todas as bandas foram mantidas antes e após o teste de estabilidade térmica, com exceção da banda presente em 2.968 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento C-H, segundo (DONALD *et al.*, 2010), e foi identificada no OE-PB e na ME antes do teste (Figura 21).

Nota-se pelos espectros obtidos (Figura 21), que a composição química da ME após o teste de submissão à variação de temperatura manteve-se semelhante ao estado inicial, antes do teste, pois os comprimentos de ondas repetiram-se em sua maioria.

Figura 21 - Espectros do óleo essencial (OE-PB) e da microemulsão (ME-PB) de *Pectis brevipedunculata*, e seu branco (ME-BRANCO) antes e após o teste de estabilidade térmica da microemulsão.



Fonte: Autora (2024).

Os demais resultados obtidos no teste de estabilidade térmica da ME estão expostos na seção 4.4.2.

4.2 Caracterização físico-química dos óleos essenciais

4.2.1 Caracterização físico-química do óleo essencial de *Duguetia stelechantha*

O resultado da caracterização do OE de *D. stelechantha* em relação à densidade, pH e índice de refração, e da umidade do vegetal estão dispostos na Tabela 6:

Tabela 6 - Caracterização físico-química do óleo essencial extraído das folhas de *Duguetia stelechantha* (OE-DU).

AMOSTRAS	UMIDADE DO VEGETAL	DENSIDADE (g/mL)	pH	ÍNDICE DE REFRAÇÃO
OE-DU	15,57% ± 0,02	0,87 ± 0,01	4,95 ± 0,01	1,48 ± 0,02

Fonte: Autora (2024).

Nota: Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão.

A umidade das folhas da planta foi verificada após 48h da coleta, e imediatamente antes da extração do OE. O teor de umidade foi de 15,57%.

A densidade do OE-DU foi de 0,87g/mL. Valor este próximo ao encontrado para outra espécie da mesma família (Annonaceae) da *D.stelechantha*, a *Guatteria citriodora Ducke*, que obteve densidade igual a 0,88 g/mL (RABELO *et al.*, 2008). Esses valores estão conforme os parâmetros que caracterizam OEs, que varia de 0,69 a 1,11 g/mL (SIMÕES; SPITZER, 2007). O potencial hidrogeniônico do OE-DU foi de 4,95 e o índice de refração do OE-DU foi de 1,48.

4.2.2 Caracterização físico-química do óleo essencial de *Pectis brevipedunculata*

O resultado da caracterização do OE de *P. brevipedunculata* em relação à densidade, pH e índice de refração, e da umidade do vegetal estão dispostos na Tabela 7:

Tabela 7 - Caracterização físico-química do óleo essencial extraído das partes aéreas de *Pectis brevipedunculata* (OE-PB).

AMOSTRAS	UMIDADE DO VEGETAL	DENSIDADE (g/mL)	pH	ÍNDICE DE REFRAÇÃO
OE-PB	10,84% ± 0,66	0,87 ± 0,02	6,00 ± 0,01	1,44 ± 0,02

Fonte: Autora (2024).

Nota: Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão.

O teor de umidade da amostra vegetal foi 10,84%, valor este próximo ao citado na literatura, de 10% b.u. (base úmida) (OLIVEIRA *et al.*, 2011), estando conforme também com as farmacopeias, que recomendam teores de umidade da planta entre 8 e 14% (FARIAS, 2007).

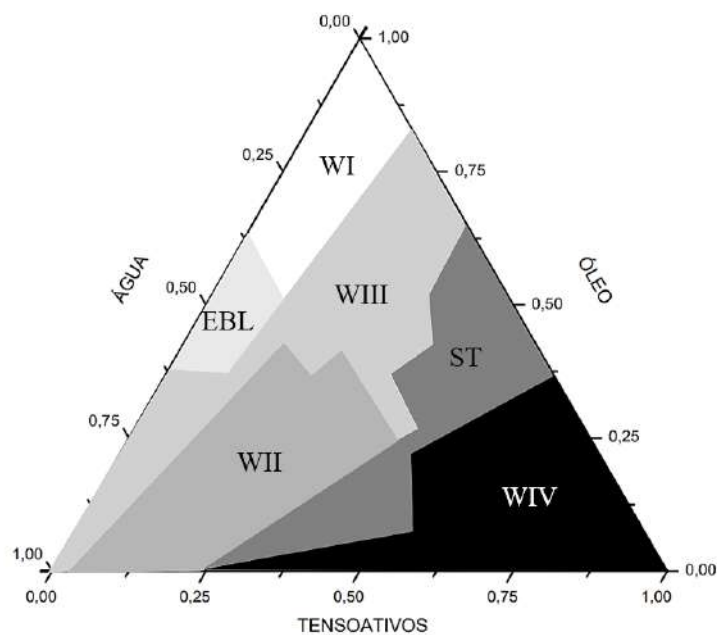
A densidade do OE-PB foi 0,87g/mL, próximo à relatada para a espécie *Senecio brasiliensis* (Spreng.) Less., de 0,85g/mL, que pertence ao gênero *Senecio* e a mesma família (Asteraceae) de *P. brevipedunculata* (HEEP, 2007). Esses valores estão conforme os parâmetros que caracterizam OEs, que varia de 0,69 a 1,11 g/mL (SIMÕES; SPITZER, 2007). O índice de refração do OE-PB foi 1,44, semelhante ao do *Senecio brasiliensis*, espécie do gênero *Senecio* e família Asteraceae, que é 1,49 (HEEP, 2007). O potencial hidrogênionico OE-PB foi de 6,00.

4.3 Desenvolvimento de microemulsão e incorporação de óleo essencial

Os sistemas resultantes das 81 formulações desenvolvidas com as diferentes proporções de tensoativos:óleo:água originaram regiões específicas no diagrama de fases (Figura 22), que são as regiões da Classificação de Winsor: WI (Winsor I, sistema bifásico formado por uma

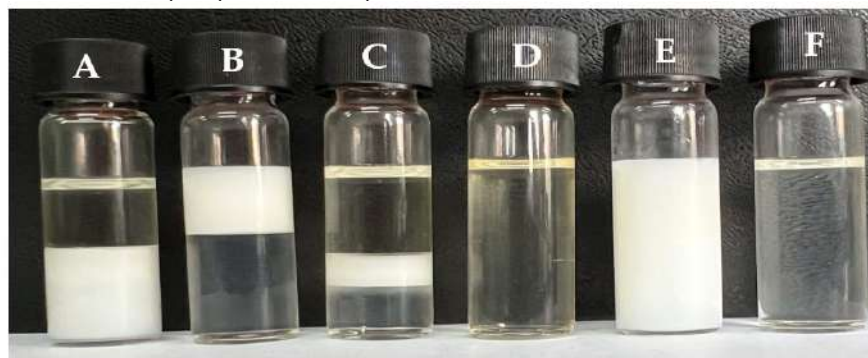
fase oleosa em equilíbrio com uma fase emulsionada); WII (Winsor II, sistema bifásico formado por uma fase aquosa em equilíbrio com uma fase emulsionada); WIII (Winsor III, sistema trifásico formado por uma fase aquosa e uma fase oleosa, intermediada por uma fase emulsionada); WIV (Winsor IV, sistema monofásico); além de emulsão líquida branco leitosa e sistema turvo (Figura 23).

Figura 22 - Diagrama de fases com a classificação de Winsor (1948): WI (Winsor I, sistema bifásico formado por uma fase oleosa em equilíbrio com uma fase emulsionada); WII (Winsor II, sistema bifásico formado por uma fase aquosa em equilíbrio com uma fase emulsionada); WIII (Winsor III, sistema trifásico formado por uma fase aquosa e uma fase oleosa, intermediada por uma fase emulsionada); WIV (Winsor IV, sistema monofásico, a região da microemulsão); EBL (Emulsão líquida branco leitosa); ST (Sistema turvo).



Fonte: Autora (2024).

Figura 23 - Representação da classificação de Winsor (1948). A (Winsor I, sistema bifásico formado por uma fase oleosa em equilíbrio com uma fase emulsionada); B (Winsor II, sistema bifásico formado por uma fase aquosa em equilíbrio com uma fase emulsionada); C (Winsor III, sistema trifásico formado por uma fase aquosa e uma fase oleosa, intermediada por uma fase emulsionada); D (Winsor IV, sistema monofásico, região de microemulsão); E (emulsão líquida branco leitosa); F (sistema turvo).



Fonte: Autora (2024).

Os sistemas monofásicos, líquidos, opticamente transparentes e estáveis foram identificados como microemulsões e estão alocados na região WIV do diagrama. Desta região do diagrama de fases foram obtidos um total de 18 MEs, sendo 9 MEs provenientes de formulações com proporção 9:1, 5 MEs com proporção 8:2 e 4 MEs com proporção 7:3.

Essas formulações de MEs apresentam percentuais de OE variando de 3,6 a 25%. A proporção da ME selecionada foi 7:3:4, que contém a composição apresentada na Tabela 8, com o OE incorporado ao sistema na concentração de 20%. Optou-se por esta concentração intermediária de OE, tendo em vista o melhor aproveitamento dos princípios ativos e a melhor eficiência no desenvolvimento das atividade biológicas.

Tabela 8 - Composição da microemulsão.

COMPONENTE	FUNÇÃO	PROPORÇÃO
Tween 80	Surfactante	26,7%
Transcutol P	Co-surfactante	26,7%
OE	Fase oleosa	20,0%
Água destilada	Fase Aquosa	26,6%

Fonte: Autora (2024).

4.4 Caracterização físico-química das microemulsões

*4.4.1 Caracterização físico-química da microemulsão de *Duguetia stelechantha**

A avaliação visual da microemulsão definiu a formulação transparente, límpida, homogênea, apresentando apenas uma fase no sistema microemulsionado (Figura 24).

A formulação representa uma microemulsão óleo-água. Este tipo de ME contém a fase oleosa dissolvida no interior hidrofóbico de micelas, com tendência a formar micelas mistas quando em diluição infinita (OLIVEIRA *et al.*, 2004). O tamanho da partícula da microemulsão, índice de polidispersão e potencial zeta estão dispostos na Tabela 9.

Figura 24 - Microemulsão com óleo essencial das folhas de *Duguetia stelechantha* incorporado (ME-DU).



Fonte: Autora (2024).

Tabela 9 - Caracterização da microemulsão (ME-DU) formulada com óleo essencial de *Duguetia stelechantha* e do branco da microemulsão (ME-BRANCO) em relação ao tamanho da partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.

FORMULAÇÃO	TAMANHO DA PARTÍCULA (nm)	ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO	POTENCIAL ZETA (mV)
ME-DU	32,35 ± 0,49	0,49 ± 0,01	-22,6
ME-BRANCO	17,18 ± 8,43	0,35 ± 0,07	- 25,0

Fonte: Autora (2024).

Nota: Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão.

O tamanho nanométrico da partícula da ME-DU (32,35 nm) foi conforme previsto na literatura, entre 10 e 150 nm (SILVA *et al.*, 2009). O tamanho das partículas do branco da ME (ME-BRANCO), ou seja, a formulação sem a incorporação do OE-DU (17,18 nm) também está de acordo com o estabelecido.

O índice de polidispersão (IPD) de ME-DU (0,49) e ME-BRANCO (0,35) também estão como proposto na literatura, com valores inferiores a 0,5, indicando homogeneidade do tamanho da gotícula (ÜSTÜNDAĞ *et al.*, 2011).

O potencial zeta sinalizou valores negativos tanto para ME-DU quanto para ME-BRANCO, de -22,6 mV e -25,0 mV, respectivamente. Sistemas estáveis apresentam potencial zeta igual ou superior a 20 mV (BOSE *et al.*, 2013). Este parâmetro pode ser positivo ou negativo e está associado às partículas do óleo ou às cargas dos surfactantes empregados na ME (Bedin, 2011). A negatividade do potencial pode ser atribuída a presença de grupos químicos dos tensoativos que se ionizam, formando partículas carregadas negativamente. Portanto, MEs formuladas com tensoativos não-iônicos, como é o caso do Tween 80, utilizado nesta pesquisa, podem apresentar estabilidade mesmo com potencial zeta negativo (AGGARWAL *et al.*, 2013).

Estudos com tensoativos não-iônicos, como Tween 20, Span 80, Labrasol e outros, também investigaram valores negativos para potencial zeta. Nanoemulsão preparada com o OE extraído de *Cymbopogon martinii* e os surfactantes Tween 20 e Span 80 obteve um potencial zeta de -16,6 mV a -34,5 mV (LYRA, 2019), enquanto as microemulsões obtidas a partir dos OEs extraídos de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus* e com os surfactantes labrasol, plurol oleique e Miristato de isopropila relataram potenciais zetas de -38,3 mV e -52,8 mV, respectivamente (PIRES, 2014).

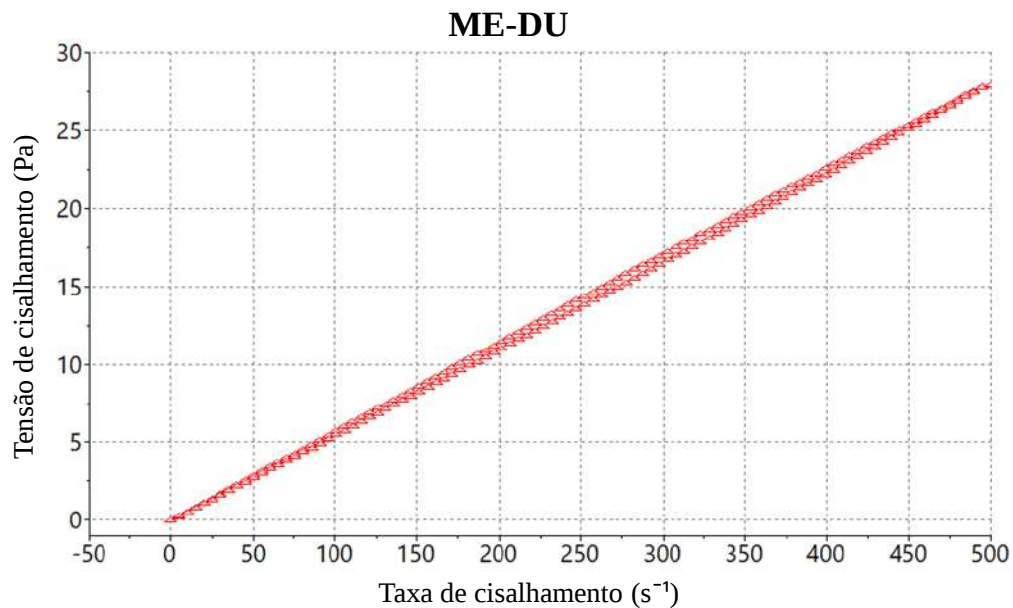
A análise reológica demonstrou que a ME-DU e o ME-BRANCO desempenharam comportamento newtoniano. A análise reológica informa se o comportamento do fluido está relacionado com o tipo e grau de organização do sistema microemulsionado (FORMARIZ *et*

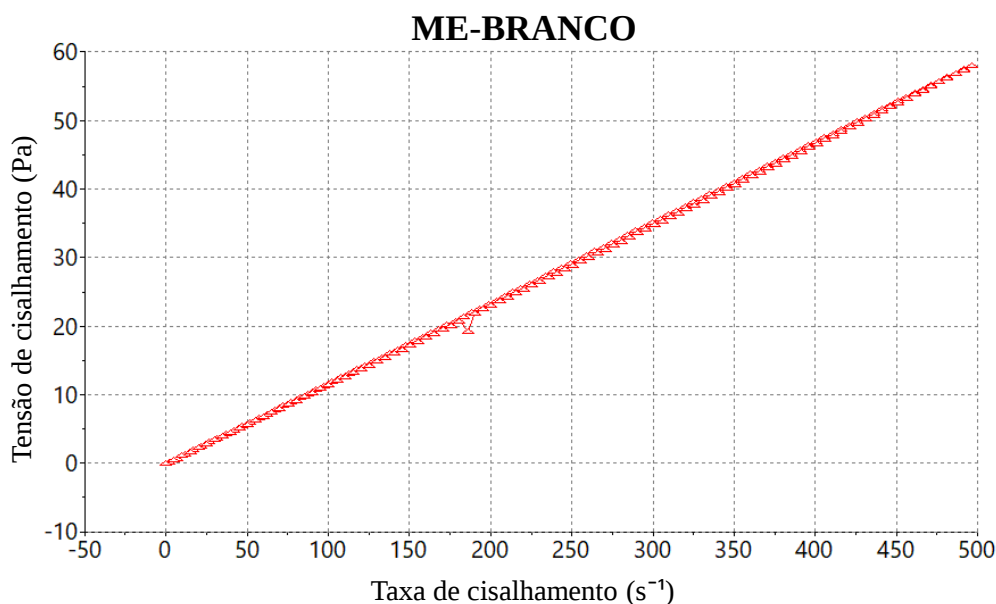
al., 2005). Sistemas com partículas de tamanho pequeno e com baixa interação entre elas determinam o comportamento newtoniano de microemulsões (SANTANA *et al.*, 2012).

Os reogramas (Figura 25) representam a sobreposição das curvas ascendentes e descendentes, originando uma reta que passa pela origem dos eixos, mostrando a relação linear entre a taxa e a tensão de cisalhamento, ou seja, nos fluídos newtonianos a tensão de cisalhamento é diretamente proporcional à taxa de deformação (SCHRAMM, 2006). Resultados semelhantes foram encontrados por do Nascimento *et al* (2023) e Nascimento (2016).

Na reta gerada, que passa pela origem dos eixos, todos os pares de valores de taxa e tensão de cisalhamento são constantes, portanto, a viscosidade de fluídos newtonianos é constante, pois esta propriedade não é afetada por mudanças na taxa de cisalhamento (SCHRAMM, 2006).

Figura 25 – Reogramas com a relação entre a taxa e a tensão de cisalhamento da microemulsão do óleo essencial de *Duguetia stelechantha* (ME-DU) e do branco da microemulsão (ME-BRANCO).





Fonte: Autora (2024).

Essas características reológicas são responsáveis pelas propriedades mecânicas dos fluídos, a estabilidade física e a consistência da microemulsão (NASCIMENTO, 2016).

O teste de estabilidade térmica indicou que a ME apresentou estabilidade e manteve-se sem alterações visuais após o período de avaliação. Foram realizadas verificações de densidade, pH e índice de refração da formulação e do seu branco, antes e após a submissão à variação de temperatura do teste de estabilidade (Tabela 10).

Tabela 10 - Caracterização da microemulsão formulada com o óleo essencial extraído de *Duquetia stelechantha* e do branco da microemulsão (ME-BRANCO) antes e após o teste de estabilidade térmica.

AMOSTRAS	DENSIDADE (g/mL)		pH		ÍNDICE DE REFRAÇÃO	
	ANTES	APÓS	ANTES	APÓS	ANTES	APÓS
ME-DU	$0,99 \pm 0^a$	$0,99 \pm 0,02^a$	$7,4 \pm 0,28^a$	$5,7 \pm 0,03^b$	$1,43 \pm 0^a$	$1,43 \pm 0^a$
ME-BRANCO	$0,99 \pm 0^a$	$1,02 \pm 0,02^a$	$6,81 \pm 0,27^a$	$6,5 \pm 0,30^a$	$1,42 \pm 0^a$	$1,42 \pm 0^a$

Fonte: Autora (2024).

Nota: Valores das médias das triplicatas $\pm$ desvio padrão. A diferença estatística entre as médias de cada amostra foi determinada pelo teste Anova two-way com comparação de Tukey ($p \leq 0,05$), verificando-se os parâmetros antes e após o teste de estabilidade térmica.

A densidade da ME-DU (0,99 g/mL) não foi alterada pelo tratamento térmico, enquanto a densidade do ME-BRANCO aumentou de 0,99 g/mL para 1,02 g/mL (Tabela 10). Valores semelhantes foram relatados na literatura. A ME obtida do OE de *Baccharis dracunculifolia* obteve densidade de 1,04 g/mL (LEITE, 2009) e a nanoemulsão preparada com o OE extraído do *Cymbopogon martinii* indicou densidade variando de 0,99 a 1,002 g/mL (LYRA, 2019).

A ME-DU apresentou valor de pH de 7,4 e o branco de 6,81. Após o teste de estabilidade térmica, o pH da ME-DU foi reduzido para 5,7 e o pH do ME-BRANCO para 6,5 (Tabela 10). Formulações emulsionadas contendo óleo de *Bertholletia excelsa* H.B.K também relataram uma diminuição do pH após teste de estabilidade térmica, variando de 6,5 a 6,0 (Marino, 2018). No entanto, ainda com essa alteração, o valor manteve-se dentro da faixa de pH considerada de maior estabilidade física e química para formulações, que é de 5,5 a 8,0 (FRONZA *et al.*, 2004).

O pH é um parâmetro importante relacionado à aplicação da formulação, pois quando o produto é de uso tópico, e destinado à permanência prolongada sobre a pele, o pH deve se manter na faixa entre 5,5 e 8,0, pois este é um valor próximo ao pH cutâneo (SILVA *et al.*, 2009). Nesse caso, a ME-DU é compatível com a pele.

O índice de refração da ME-DU e ME-BRANCO, 1,43 e 1,42, respectivamente, permaneceram constantes antes e depois do teste de estabilidade térmica (Tabela 10). Valores semelhantes de 1,41 a 1,45 foram relatados para a microemulsão obtida do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) (NEVES, 2013).

4.4.2 Caracterização físico-química da microemulsão de *Pectis brevipedunculata*

A aparência da ME-PB foi verificada visualmente, constituindo-se de um sistema transparente, límpido, homogêneo com apenas uma fase no microemulsionado (Figura 26).

Figura 26 - Microemulsão com óleo essencial de *Pectis brevipedunculata* incorporado (ME-PB).



Fonte: Autora (2024).

A ME-PB é do tipo óleo-água, formada por gotículas de óleo dispersas em água e um tensoativo na interface óleo/água. Esse tipo de ME possibilita a solubilização de compostos e tem sido empregada para alcançar maior estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade de fármacos (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A ME-PB foi avaliada 48 horas após sua formulação quanto ao tamanho da partícula, índice de polidispersão e potencial zeta (Tabela 11).

Tabela 11 - Caracterização da microemulsão formulada com o óleo essencial extraído das partes aéreas de *Pectis brevipedunculata* (ME-PB) e do branco da microemulsão (ME-BRANCO).

FORMULAÇÃO	TAMANHO DA PARTÍCULA (nm)	ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO	POTENCIAL ZETA (mV)
ME-PB	64,75 ± 22,24	0,37 ± 0,18	-12,9
ME-BRANCO	17,18 ± 8,43	0,35 ± 0,07	-25,0

Fonte: Autora (2024).

Nota: Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão.

O tamanho das partículas da ME-PB foi de 64,75nm, enquanto as partículas do ME-BRANCO foram de 17,18nm. Esses resultados estão de acordo com o previsto na literatura, que deve ser de 10 e 100 nm o tamanho das partículas (MUZAFFAR *et al.*, 2013; GUPTA *et al.*, 2016; TARTARO *et al.*, 2020).

O índice de polidispersão (IPD) da ME-PB foi de 0,37 e do ME-BRANCO foi de 0,35, estando de acordo com os valores recomendados para obter alta homogeneidade em sistemas microemulsionados, que deve ser menor que 0,5 (ÜSTÜNDAĞ OKUR *et al.*, 2011).

Os potenciais zeta verificados foram -12,9mV para ME-PB e -25mV para ME-BRANCO. Este parâmetro está associado ao potencial de superfície da partícula e pode ser negativo ou positivo, dependendo da natureza dos componentes da formulação (óleo e tensoativos) (KÜLKAMP *et al.*, 2009). Como já descrito na seção anterior, MEs formuladas com tensoativos não-iônicos, como o Tween 80, utilizado nesta pesquisa, podem apresentar estabilidade mesmo com potencial zeta negativo (AGGARWAL *et al.*, 2013).

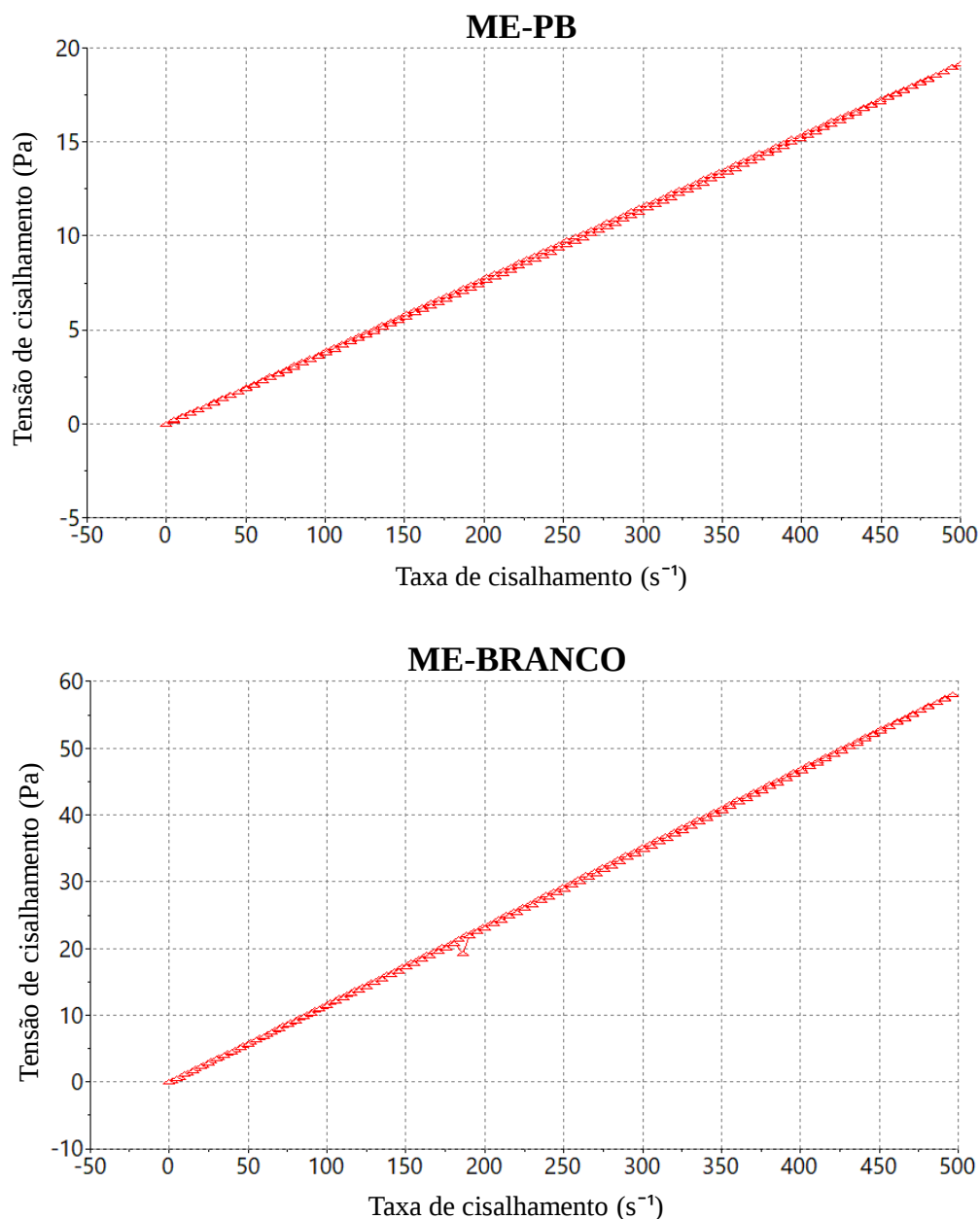
A análise reológica demonstrou que a ME-PB e o ME-BRANCO desempenharam comportamento newtoniano. A análise reológica informa se o comportamento do fluido está relacionado com o tipo e grau de organização do sistema microemulsionado (FORMARIZ *et al.*, 2005). Sistemas com partículas de tamanho pequeno e com baixa interação entre elas determinam o comportamento newtoniano de microemulsões (SANTANA *et al.*, 2012).

Os reogramas (Figura 27) representam a sobreposição das curvas ascendentes e descendentes, originando uma reta que passa pela origem dos eixos, mostrando a relação linear entre a taxa e a tensão de cisalhamento, ou seja, nos fluidos newtonianos a tensão de cisalhamento é diretamente proporcional à taxa de deformação (SCHRAMM, 2006). Resultados semelhantes foram encontrados por do Nascimento *et al* (2023) e Nascimento (2016).

Na reta gerada, que passa pela origem dos eixos, todos os pares de valores de taxa e tensão de cisalhamento são constantes, portanto, a viscosidade de fluidos newtonianos é

constante, pois esta propriedade não é afetada por mudanças na taxa de cisalhamento (SCHRAMM, 2006).

Figura 27 – Reogramas com a relação entre a taxa e a tensão de cisalhamento da microemulsão do óleo essencial de *Pectis brevipedunculata* (ME-PB) e do branco da microemulsão (ME-BRANCO).



Fonte: Autora (2024).

Essas características reológicas são responsáveis pelas propriedades mecânicas dos fluídos, a estabilidade física e a consistência da microemulsão (NASCIMENTO, 2016).

Antes e após o teste de estabilidade térmica, a ME-PB foi caracterizada em relação à densidade, pH e índice de refração (Tabela 12).

Tabela 12 - Caracterização da microemulsão formulada com óleo essencial extraído das partes aéreas de *Pectis brevipedunculata* (ME-PB) e do branco da microemulsão (ME-BRANCO) antes e após teste de estabilidade térmica.

AMOSTRAS	DENSIDADE (g/mL)		pH		ÍNDICE DE REFRAÇÃO	
	ANTES	APÓS	ANTES	APÓS	ANTES	APÓS
ME-PB	0,99 ± 0 ^a	0,98 ± 0,01 ^a	7,09 ± 0,23 ^a	5,46 ± 0,20 ^b	1,43 ± 0 ^a	1,43 ± 0 ^a
ME-BRANCO	1,00 ± 0 ^a	1,02 ± 0,02 ^a	6,81 ± 0,27 ^a	6,46 ± 0,30 ^a	1,42 ± 0 ^a	1,42 ± 0 ^a

Fonte: Autora (2024).

Nota: Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão. A diferença estatística entre as médias de cada amostra foi determinada pelo teste Anova two-way com comparação de Tukey ($p \leq 0,05$), verificando-se os parâmetros antes e após o teste de estabilidade térmica.

Após o tratamento térmico uma pequena variação de densidade foi verificada em ME-PB, diminuindo de 0,99 para 0,98g/mL, enquanto a densidade do ME-BRANCO aumentou de 1,00 para 1,02g/mL (Tabela 12). Nenhum dos dois resultados foi, porém, estatisticamente diferente. Os resultados encontrados estão próximos do disposto na literatura, como a ME de *Syzygium aromaticum* L. que apresentou densidade de 1,0050 a 1,0092 g/mL (TEIXEIRA, 2017) e a ME preparado com OE de diferentes espécies e compostos aromáticos sintéticos apresentou densidade de 1,02g/mL (MORAES JÚNIOR, 2015).

O pH da ME-PB foi de 7,09, diminuindo significativamente para 5,46 após o teste de estabilidade térmica. O pH do ME-BRANCO também apresentou redução, diminuiu de 6,81 para 6,46 (Tabela 12), porém de forma não significativa. Maiores teores de fase aquosa em microemulsões óleo-água levam à ionização da matéria orgânica, resultando em valores de pH ácidos (CIRÍACO *et al.*, 2020), portanto, a diminuição do pH observada pode ser causada pela hidrólise de componentes do sistema, como surfactantes e compostos da fase oleosa, ou ainda pelo aumento da temperatura (BRUXEL *et al.*, 2012). Embora variações do parâmetro pH tenham sido observadas após o teste de estabilidade térmica, os valores de pH ainda estão inclusos na faixa de 5,5 a 8,0, definida como a de maior estabilidade físico-química para a formulação (FRONZA *et al.*, 2004).

Os índices de refração de ME-PB e ME-BRANCO não foram alterados após o teste de estabilidade térmica (Tabela 12). Os valores encontrados chegam perto do exposto na literatura, como da ME preparada a partir de *Orbignya phalerata*, que apresentou índice de refração de 1,44 (REIS, 2014) e as MEs de *Rosmarinus officinalis* Linn., que apresentaram índices de refração variando de 1,4585 a 1,4645 (ASSIS, 2014).

4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e microemulsões

Atividade antimicrobiana envolveu bactérias gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Clostridium spp.*) e bactérias gram negativas: *Escherichia coli* e *Salmonella spp* (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

Sobre os antibióticos utilizados como controle positivo nos testes antimicrobianos, a gentamicina tem espectro de ação em bactérias gram negativas, a penicilina tem espectros contra gram positivas e a ampicilina atua tanto em bactérias gram positivas quanto em gram negativas (MACHADO *et al.*, 2019).

4.5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e da microemulsão de *Duguetia stelechantha*

O método de difusão em disco foi o ensaio preliminar para avaliar a atividade antimicrobiana das amostras. Os diâmetros dos halos de inibição produzidos pela ação antibacteriana das amostras OE-DU, OE-DU-CAS, ME-DU e ME-BRANCO, assim como os antibióticos padrões gentamicina e penicilina utilizados como controle positivo, são apresentados na Tabela 13.

A microemulsão (ME-DU) apresentou melhores resultados, com halos de inibição maiores, para todas as bactérias testadas, quando comparada ao óleo (OE-DU) e halos maiores ou semelhantes quando comparada aos antibióticos gentamicina e penicilina (Tabela 13). Ressalta-se que em ME-DU o óleo incorporado está a 20%, com 200mg/mL, enquanto na amostra OE-DU foi testado o óleo puro. O que evidencia que a formulação protege o princípio ativo, otimizando a atividade biológica.

Tabela 13 - Resultado da atividade antimicrobiana pelo método da difusão em discos dos óleos essenciais extraídos das folhas (OE-DU) e cascas (OE-DU-CAS), e da microemulsão (ME-DU) de *Duguetia stelechantha*, e seu branco (ME-BRANCO).

BACTÉRIAS	AMOSTRAS (mm)				ANTIBIÓTICOS (mm)	
	OE-DU	ME-DU	ME-BRANCO	OE -DU-CAS	Gentamicina	Penicilina
<i>Escherichia coli</i>	15,33 ± 1,15	> 50,00 ± 0	> 50,00 ± 0	14,33 ± 0,58	27,33 ± 1,15	22,67 ± 1,15
<i>Staphylococcus aureus</i>	16,33 ± 0,58	22,67 ± 1,15	0	13,67 ± 0,58	26,67 ± 1,15	38,00 ± 0
<i>Salmonella spp.</i>	16,33 ± 0,58	> 50,00 ± 0	> 50,00 ± 0	13,67 ± 0,58	23,00 ± 1,00	19,00 ± 1,00
<i>Listeria monocytogenes</i>	17,00 ± 2,00	> 50,00 ± 0	> 50,00 ± 0	16,00 ± 0	18,00 ± 0	18,00 ± 1,00

<i>Bacillus cereus</i>	0	> 50,00 ± 0	> 50,00 ± 0	0	31,00 ± 1,00	26,00 ± 3,00
<i>Clostridium spp.</i>	13,00 ± 1,00	19,00 ± 2,00	0	17,00 ± 1,00	29,00 ± 1,00	18,00 ± 0

Fonte: Autora (2024).

Nota: Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão.

O ME-BRANCO apresentou, assim como ME-DU, halos de inibição acima de 50,00mm para *Escherichia coli*, *Samonela*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*. No entanto, para *Staphylococcus aureus* e *Clostridium spp.* não apresentou halos, enquanto ME-DU apresentou 22,67 e 19,00 mm (Tabela 13), respectivamente, evidenciando que os constituintes do óleo realizam efeito contra as bactérias, independente dos tensoativos utilizados na formulação.

A amostra OE-DU-CAS apresentou resultados semelhantes ao OE-DU (Tabela 13). O caule deste vegetal é caracterizado na literatura como antibacteriana (MAAS *et al.*, 2003).

A atividade antimicrobiana verificada é desenvolvida por compostos como os monoterpenos α -pineno e β -pineno, e o sesquiterpeno espatulenol, que destacam-se entre os majoritários das amostras, e tem atividade antibacteriana comprovada (COSTA, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Espécies do gênero *Duguetia*, como *D. gardneriana* e *D. moricandiana* apresentaram halos de 12,00 mm para a bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Essas espécies contêm entre os principais compostos α -pineno e β -pineno (ALMEIDA *et al.*, 2010). O OE das cascas de *D. lanceolata* barks foi testado contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e proporcionou halos de 15,00 e 10,00 mmm, respectivamente (SOUSA *et al.*, 2012).

Os OEs com seus constituintes atuam causando danos à estrutura da membrana citoplasmática das bactérias, interagem com os lipídeos e proteínas da membrana afetando sua permeabilidade e integridade da estrutura, modificam o DNA, as concentrações de ATP intra e extracelulares, dentre outras alterações, podendo ocasionar a desestruturação celular (NAZZARO *et al.*, 2013).

O método de difusão em disco, ou em ágar, pode apresentar resultados com atividade antibacteriana moderada de OEs, quando comparado ao método de diluição em caldo. A absorção e dispersão dos componentes de OEs no substrato pode ser comprometida, pois o OE, por ter caráter lipofílico, e o meio de cultura, por ter predomínio de constituintes polares, como água e ágar, apresentam pouca afinidade (SANTIAGO *et al.*, 2016). A mesma situação pode ser relacionada aos tensoativos lipofílicos utilizados nas formulações.

A atividade antimicrobiana das amostras também foi avaliada pelo método de diluição em caldo. A CIM do OE-DU, OE-DU-CAS, ME-DU e ME-BRANCO, assim como dos

antibióticos do controle positivo, ampicilina e gentamicina, são apresentados na Tabela 14. As CIMs foram detectadas pela ausência de turvação visível nos tubos. A leitura visual também verificou a mudança de coloração após redução da resazurina em resofurina, apresentando coloração azul quando em ausência de células viáveis e coloração rosa indicando crescimento microbiano.

Tabela 14 - Resultado da atividade antimicrobiana pelo método da diluição em caldo, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais extraídos das folhas (OE-DU) e das cascas (OE-DU-CAS), e da microemulsão (ME-DU) de *Duguetia stelechantha*, e seu branco (ME-BRANCO).

BACTÉRIAS	AMOSTRAS (µg/mL)				ANTIBIÓTICOS	
	OE-DU	ME-DU	ME-BRANCO	OE-DU-CAS	Ampicilina	Gentamicina
<i>Escherichia coli</i>	1.000	125,00	> 1.600	> 1.600	18,00	8,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	500,00	62,50	> 1.600	> 1.600	10,00	6,00
<i>Salmonela spp.</i>	125,00	62,50	> 1.600	> 1.600	16,00	8,00
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.500	250,00	> 1.600	> 1.600	24,00	18,00
<i>Bacillus cereus</i>	250,00	62,50	> 1.600	> 1.600	20,00	16,00
<i>Clostridium spp.</i>	> 1.600	250,00	> 1.600	1.500	16,00	16,00

Fonte: Autora (2024).

Uma amostra desempenha forte inibição antimicrobiana quando $CIM \leq 500 \mu\text{g/mL}$, apresenta inibição moderada quando CIM for entre $600 \mu\text{g/mL}$ e $1.500 \mu\text{g/mL}$, e tem inibição fraca quando $CIM > 1.600 \mu\text{g/mL}$ (ALIGIANNIS *et al.*, 2001). Alguns autores consideram a amostra inativa quando CIM for superior a $1.000 \mu\text{g/mL}$ (AYRES *et al.*, 2008). Sendo assim, OE-DU apresenta forte ação antibacteriana contra *Salmonela spp.*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, tem inibição moderada frente a *Escherichia coli* e fraca inibição contra *Listeria monocytogenes* e *Clostridium spp.* (Tabela 14). ME-DU indicou valores de CIM inferiores aos obtidos pela ação do OE-DU, sendo que a microemulsão foi considerada com forte inibição frente a todas as bactérias testadas, apresentando concentrações inibitórias de 62,50 a 250,00 $\mu\text{g/mL}$. Estes valores de concentrações apresentados pela ME-DU foram superiores aos indicados pelo controle positivo da ampicilina e gentamicina (Tabela 14). O ME-BRANCO, no entanto, foi determinado como inativo, de acordo com Ayres *et al.* (2008), para todas as bactérias pesquisadas e apresentou $CIM > 1.600 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 14), o que comprova que a inativação bacteriana está sendo realizada pela ação dos princípios ativos do óleo incorporado na microemulsão, e não pelo efeito dos tensoativos empregados na formulação. O óleo extraído das cascas, OE-DU-CAS, foi considerado com fraca inibição contra *Clostridium spp.* (CIM 1.500 $\mu\text{g/mL}$), segundo Aligiannis *et al.* (2001), e inativo para as demais bactérias, de acordo com Ayres *et al.* (2008), com CIM de $> 1.600 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 14).

Outras espécies do gênero *Duguetia* tem potencial de inibição de bactérias em concentração baixas, como a *D. lanceolata* barks, que oferta OE a partir de suas cascas com CIM de 60,00 µg/mL para *Staphylococcus aureus* (SOUSA *et al.*, 2012). Assim como espécies de outros gêneros da Família Annonaceae, como a *X. frutescens*, do gênero *Xylopi*a, que apresentou CIM de 400 µg/mL para *Staphylococcus aureus* (BARBOSA, 2017).

A atividade antimicrobiana foi avaliada ainda antes e após o teste de estabilidade térmica (Tabela 15) para determinar se a temperatura afeta a atividade biológica da microemulsão.

Tabela 15 - Resultado da atividade antimicrobiana pelo método da diluição em caldo, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da microemulsão (ME-DU) de *Duguetia stelechantha* e seu branco (ME-BRANCO) antes e após teste de estabilidade térmica.

BACTÉRIAS	AMOSTRAS (µg/mL)			
	ME-DU ANTES	ME-DU APÓS	ME-BRANCO ANTES	ME-BRANCO APÓS
<i>Escherichia coli</i>	125,00 ^a	125,00 ^a	> 1.600 ^a	> 1.600 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	62,50 ^a	125,00 ^b	> 1.600 ^a	> 1.600 ^a
<i>Salmonela spp.</i>	62,50 ^a	125,00 ^b	> 1.600 ^a	> 1.600 ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	250,00 ^a	250,00 ^a	> 1.600 ^a	> 1.600 ^a
<i>Bacillus cereus</i>	62,50 ^a	250,00 ^b	> 1.600 ^a	> 1.600 ^a
<i>Clostridium spp.</i>	250,00 ^a	1.500 ^b	> 1.600 ^a	> 1.600 ^a

Fonte: Autora (2024).

Nota: A diferença estatística entre as médias de cada amostra foi determinada pelo teste Anova two-way com comparação de Tukey ($p \leq 0,05$), verificando-se os parâmetros antes e após o teste de estabilidade térmica.

Após o teste, a ME-DU continuou apresentando forte inibição antimicrobiana para todas as bactérias verificadas, com exceção do *Clostridium spp.*, que com CIM de 1.500 µg/mL, foi considerada de inibição moderada. A análise estatística indica que não houve diferença significativa entre os resultados alcançados antes e após o teste para *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. O ME-BRANCO apresentou valores de CIM, > 1.600 µg/mL, permanecendo como amostra inativa para todas as bactérias pesquisadas (Tabela 15).

4.5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e da microemulsão de *Pectis brevipedunculata*

Os diâmetros dos halos de inibição produzidos pela ação antimicrobiana das amostras OE-PB, ME-PB, ME-BRANCO e dos antibióticos gentamicina e penicilina estão na Tabela 16.

Tabela 16 - Resultado da atividade antimicrobiana pelo método da difusão em discos do óleo essencial (OE-PB) e microemulsão (ME-PB) de *Pectis brevipedunculata* e seu branco (ME-BRANCO).

BACTÉRIAS	AMOSTRAS (mm)			ANTIBIÓTICOS (mm)	
	OE-PB	ME-PB	ME-BRANCO	Gentamicina	Penicilina
<i>Escherichia coli</i>	41,33 ± 7,57	> 50,00 ± 0	> 50,00 ± 0	27,33 ± 1,15	22,67 ± 1,15
<i>Staphylococcus aureus</i>	> 50,00 ± 0	> 50,00 ± 0	0	26,67 ± 1,15	38,00 ± 0
<i>Salmonela spp.</i>	23,67 ± 1,16	> 50,00 ± 0	> 50,00 ± 0	23,00 ± 1,00	19,00 ± 1,00
<i>Listeria monocytogenes</i>	32,67 ± 2,31	> 50,00 ± 0	> 50,00 ± 0	18,00 ± 0	18,00 ± 1,00
<i>Bacillus cereus</i>	17,67 ± 0,58	> 50,00 ± 0	> 50,00 ± 0	31,00 ± 1,00	26,00 ± 3,00
<i>Clostridium spp.</i>	17,67 ± 0,58	> 50,00 ± 0	0	29,00 ± 1,00	18,00 ± 0

Fonte: Autora (2024).

Nota: Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão.

A microemulsão do óleo de *P. brevipedunculata*, ME-PB, obteve halos de inibição acima de 50,0 mm para todas as bactérias pesquisadas. Sendo esses resultados superiores aos encontrados para o óleo, OE-PB, que foram de 17,67 a 41,33mm, com exceção de *Staphylococcus aureus*, que também apresentou halo de inibição > 50,0 mm. O OE-PB apresentou inibição maior que os antibióticos do controle positivo para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonela spp.* e *Listeria monocytogenes* (Tabela 16).

O ME-BRANCO aqui formulado não apresentou halo de inibição para *Staphylococcus aureus* e *Clostridium spp.*, e como comentando anteriormente, o óleo apresentou halo de diâmetro significativo, > 50,0 mm (Tabela 16), para esta primeira bactéria, o que comprova que a inibição das bactérias pela microemulsão ocorre pelo efeito dos princípios ativos do óleo, e não pelos tensoativos utilizados na formulação. Os demais halos de inibição realizados pelo ME-BRANCO podem ser justificados pelo caráter lipofílico das substâncias presentes, que interferem e modificam a membrana plasmática desses microrganismos causando uma desestruturação celular.

Diâmetros inferiores da zona de inibição foram produzidos pelo OE de *P. brevipedunculata* pesquisado por Marques *et al.* (2013), que encontraram 10 mm para *Escherichia coli* e 22 mm para *Staphylococcus aureus*. Ressalta-se que no estudo citado, os pesquisadores solubilizaram o OE de *P. brevipedunculata* em DMSO e diluíram em água destilada na proporção de 1:2 (V/V), obtendo tais resultados para as bactérias gram-negativa e gram-positiva, o que pode justificar os resultados encontrados.

Os compostos que se destacam por desempenhar a atividade antimicrobiana de *P. brevipedunculata* são os isômeros Z-citral ou neral e E-citral ou geranial, que constituem o citral, um monoterpene que ocorre naturalmente em ervas, plantas e frutas cítricas, possui

atividade antifúngica, bactericida, inseticida, expectorante, tem propriedades espasmolíticas e apresenta ainda efeitos diuréticos e anti-inflamatórios (LU *et al.*, 2018).

Um estudo realizado para verificar a atividade bactericida de nanoemulsão a base de citral obteve halos de inibição de 9,4 mm para *Escherichia coli*, 19,2 mm para *Staphylococcus aureus* e 14,4 mm para *Listeria monocytogenes* (LU *et al.*, 2018). Todos esses resultados inferiores aos encontrados para ME-DU.

Outros compostos monoterpênicos de *P. brevipedunculata* também possuem ação contra microrganismos comprovada, como o α -pineno e o limoneno (COSTA, 2017; CARDOSO, 2021).

As CIMs do OE-PB, ME-PB e ME-BRANCO frente às cepas de bactérias, pelo método de diluição em caldo estão presentes na Tabela 17.

Tabela 17 - Resultado da atividade antimicrobiana pelo método da diluição em caldo, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial (OE-PB) e da microemulsão (ME-PB) de *Pectis brevipedunculata* e seu branco (ME-BRANCO).

BACTÉRIAS	AMOSTRAS ($\mu\text{g/mL}$)			ANTIBIÓTICOS	
	OE-PB	ME-PB	ME-BRANCO	Ampicilina	Gentamicina
<i>Escherichia coli</i>	125,00	62,50	> 1.600	18,00	8,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	125,00	62,50	> 1.600	10,00	6,00
<i>Salmonella spp.</i>	1.000	250,00	> 1.600	16,00	8,00
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.000	62,50	> 1.600	24,00	18,00
<i>Bacillus cereus</i>	250,00	125,00	> 1.600	20,00	16,00
<i>Clostridium spp.</i>	1.200	250,00	> 1.600	16,00	16,00

Fonte: Autora (2024).

O OE-PB é considerado de forte inibição antimicrobiana para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, pois tem $\text{CIM} \leq 500 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 17), e tem inibição moderada frente a *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium spp.*, pois o CIM foi entre $600 \mu\text{g/mL}$ e $1.500 \mu\text{g/mL}$, segundo as recomendações de Aligiannis *et al.* (2001). A ME-PB apresentou concentrações inibitórias inferiores ao óleo, e é definida como de forte inibição antimicrobiana para todas as bactérias testadas, apresentando CIM de 62,50 a $250,00 \mu\text{g/mL}$. O ME-BRANCO, como já dito na seção anterior, é considerado, pelas diretrizes de (AYRES *et al.*, 2008), amostra inativa, com $\text{CIM} > 1.600 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 17).

Outras espécies do gênero *Pectis* que contém geranial e neral como majoritários também apresentaram ação bactericida, como *Pectis elongata* Kunth., que obteve CIM de $15,10 \mu\text{g/mL}$ para *Listeria monocytogenes* e $29,20 \mu\text{g/mL}$ para *Bacillus cereus* (SILVA *et al.*, 2021).

Com os valores obtidos, infere-se que o citral realiza seu mecanismo de ação em baixas concentrações. O composto consegue ultrapassar a parede celular das bactérias, o que causa a desnaturação protéica, perda de material citoplasmático, modificação da membrana celular e resulta em morte celular (LU *et al.*, 2018). Formulações contendo citral agem por quatro rotas de entregas principais: realiza transporte passivo através da membrana celular externa melhorando a interação com as membranas citoplasmáticas; as partículas do tensoativo interagem com a bicamada fosfolipídica da membrana celular e promove a liberação direcionada dos OEs; ocorre a liberação controlada das gotículas de OEs, que tiveram partição entre a fase oleosa e a fase aquosa da formulação, o que gera o prolongamento da atividade dos compostos; e a concentração de OEs no local de ação aumenta em virtude da interação eletrostática das gotículas da formulação carregadas positivamente com paredes celulares microbianas carregadas negativamente (LU *et al.*, 2018).

Apesar das atividades biológicas já comprovadas para o citral, este apresenta algumas características que necessitam de estratégias para melhor aproveitamento do composto. O citral é insolúvel em água em pH neutro e pode ter sua atividade antimicrobiana reduzida por ser suscetível à degradação oxidativa em condições normais de armazenamento. Sendo assim, a tecnologia de nano ou microemulsão pode ser empregada com a finalidade de microencapsular, solubilizar e proteger esse composto (LU *et al.*, 2018).

Para investigar a permanência do efeito dos princípios ativos e da atividade biológica da microemulsão foi realizado um acompanhamento da formulação antes e após um teste de estabilidade térmica. O mesmo ocorreu para o branco da microemulsão (Tabela 18).

Tabela 18 - Resultado da atividade antimicrobiana pelo método da diluição em caldo, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da microemulsão (ME-PB) de *Pectis brevipedunculata* e seu branco (ME-BRANCO) antes e após teste de estabilidade térmica.

BACTÉRIAS	AMOSTRAS (µg/mL)			
	ME-PB ANTES	ME-PB APÓS	ME-BRANCO ANTES	ME-BRANCO APÓS
<i>Escherichia coli</i>	62,50 ^a	125,00 ^b	> 1.600 ^a	> 1.600 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	62,50 ^a	250,00 ^b	> 1.600 ^a	> 1.600 ^a
<i>Salmonela spp.</i>	250,00 ^a	125,00 ^b	> 1.600 ^a	> 1.600 ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	62,50 ^a	250,00 ^b	> 1.600 ^a	> 1.600 ^a
<i>Bacillus cereus</i>	125,00 ^a	125,00 ^a	> 1.600 ^a	> 1.600 ^a
<i>Clostridium spp.</i>	250,00 ^a	250,00 ^a	> 1.600 ^a	> 1.600 ^a

Fonte: Autora (2024).

Nota: A diferença estatística entre as médias de cada amostra foi determinada pelo teste Anova two-way com comparação de Tukey ($p \leq 0,05$), verificando-se os parâmetros antes e após o teste de estabilidade térmica.

Após o teste de estabilidade, a atividade antimicrobiana da ME-DU não foi afetada, a amostra continuou desempenhando forte inibição bacteriana para todas as bactérias, com CIM de 125,00 e 250,00 µg/mL. Comparando estatisticamente o antes e após o teste, para as bactérias *Bacillus cereus* e *Clostridium spp.* não houve diferença significativa, para as demais houve diferença significativa, mas como mencionado, não interferiu na ação antibacteriana.

O ME-BRANCO alcançou valores de CIM > 1.600 µg/mL, mostrando sua inatividade. Para todas as amostras testadas com o branco não houve diferença significativa.

4.6 Avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais e microemulsões

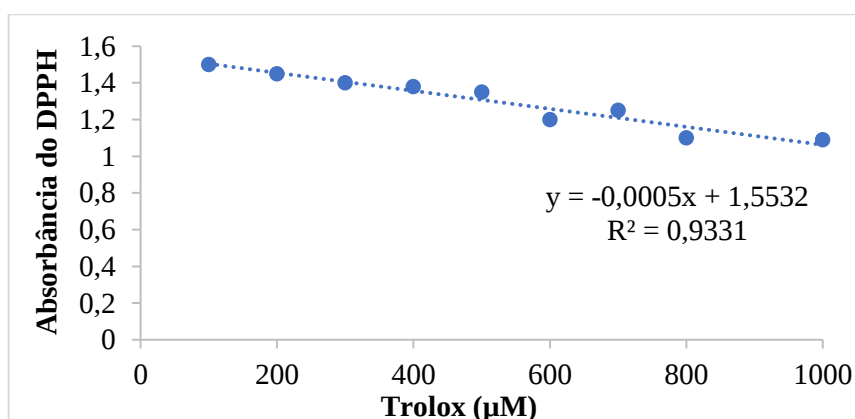
4.6.1 Avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais e da microemulsão de *Dugetia stelechantha*

A curva de calibração do trolox por DPPH é a apresentada na Figura 27. A variação da absorbância em relação à concentração é representada pela equação da reta, equação 7, que obteve valor de $R^2 = 0,9331$.

$$y = -0,0005x + 1,5532 \quad (7)$$

Os valores do coeficiente angular (0,0005) e do coeficiente linear (1,5532) obtidos da curva de calibração (Figura 28), foram utilizados no cálculo da concentração de antioxidantes (CT), conforme equação 3. E esta determinou a capacidade antioxidante total dos compostos equivalentes ao Trolox (µM/g). Os resultados das amostras do óleo essencial (OE-DU) e microemulsão (ME-DU) de *Dugetia stelechantha*, e seu branco (ME-BRANCO) são apresentados na Tabela 19.

Figura 28 - Curva de calibração do antioxidante padrão trolox por DPPH.



Fonte: Autora (2024).

Tabela 19 - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox no óleo essencial (OE-DU) e microemulsão (ME-DU) de *Duguetia stelechantha*, e seu branco (ME-BRANCO) pelo método DPPH.

Amostras	Atividade antioxidante ($\mu\text{MTrolox/g}$)* DPPH
OE-DU	628,10 $\pm$ 3,85 ^a
ME-DU	979,90 $\pm$ 16,34 ^b
ME-BRANCO	346,40 $\pm$ 30,81 ^c

Fonte: Autora (2024).

Nota: * Valores das médias das triplicatas $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste Anova two-way com comparação de Tukey ($p \leq 0,05$).

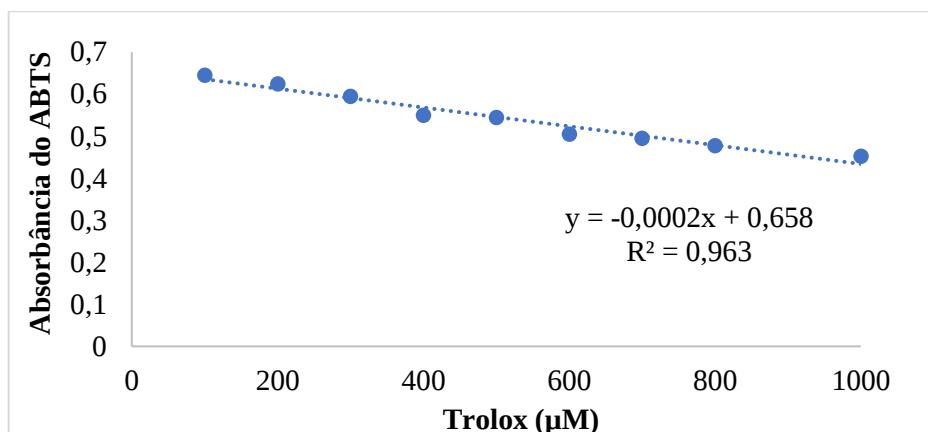
O OE-DU apresentou concentração de antioxidantes de 628,10 μmol de Trolox por grama da amostra. A ME-DU obteve valor de antioxidantes superior ao OE-DU, de 979,90 $\mu\text{MTrolox/g}$ (Tabela 19). Ressalta-se que a amostra de OE-DU foi diluída em álcool etílico absoluto a fim de alcançar a mesma concentração do OE incorporado na ME, de 200mg/mL, ou seja, as amostras encontram-se na mesma concentração. No entanto, a ME apresentou uma concentração de antioxidantes melhor que o OE. E pode-se inferir que essa atividade é resultado dos princípios ativos protegidos na formulação, e não dos tensoativos presentes no sistema, pois o ME-BRANCO obteve o menor valor entre as três amostras testadas, de 346,40 $\mu\text{MTrolox/g}$ (Tabela 19).

A curva de calibração do trolox por ABTS é a apresentada na Figura 26. A variação da absorbância em relação à concentração é representada pela equação da reta, equação 8, que obteve valor de $R^2 = 0,963$.

$$y = -0,0002x + 0,658 \quad (8)$$

Os valores do coeficiente angular (0,0002) e do coeficiente linear (0,658) obtidos da curva de calibração (Figura 29), foram utilizados no cálculo da concentração de antioxidantes (CT), conforme equação 3. E esta determinou a capacidade antioxidante total dos compostos equivalentes ao Trolox ($\mu\text{M/g}$).

Figura 29 - Curva de calibração do antioxidante padrão trolox por ABTS.



Fonte: Autora (2024).

Os resultados das amostras do óleo essencial (OE-DU) e microemulsão (ME-DU) de *Duguetia stelechantha*, e seu branco (ME-BRANCO) são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox no óleo essencial (OE-DU) e microemulsão (ME-DU) de *Duguetia stelechantha*, e seu branco (ME-BRANCO) pelo método ABTS.

Amostras	Atividade antioxidante (µMTrolox/g)* ABTS
OE-DU	821,60 ± 22,39 ^a
ME-DU	1.527 ± 0,74 ^b
ME-BRANCO	394,80 ± 24,79 ^c

Fonte: Autora (2024).

Nota: * Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste Anova two-way com comparação de Tukey ($p \leq 0,05$).

Quando testado pelo método ABTS, o OE-DU apresentou 821,60 µmol de Trolox por grama da amostra. A ME-DU indicou 1.527 µMTrolox/g. E ME-BRANCO obteve 394,80 µMTrolox/g (Tabela 20). Tais resultados comprovam que formulações como as MEs aumentam o potencial antioxidante de amostras.

Consta na literatura o potencial antioxidante de OEs de espécies de Annonaceae avaliados por diferentes métodos e comparados com vários padrões. A atividade antioxidante de *D. lanceolata* branches, espécie do gênero *Duguetia*, que tem β-pineno como um dos compostos majoritários do seu OE, obteve pelo método DPPH 159,4 µg/mL, utilizando como padrão a rutina (SOUSA *et al.*, 2016). O OE de *Xylopia sericea* A. St.-Hil., espécie do gênero *Xylopia*, que tem o sesquiterpenos espatulenol como um dos principais compostos identificados, mostrou atividade antioxidante significativa ($CI_{50}=49,10$ µg/mL) pelo método DPPH, utilizando como controles positivos o ácido ascórbico, quercetina e α-tocoferol (MENDES *et al.*, 2017). O OE de *X. frutescens*, espécie do gênero *Xylopia*, apresentou no ensaio de DPPH um $CI_{50} = 391,3$ µg/ml e foi comparado com o BHT, antioxidante comercial,

que tem $CI_{50} = 35,04 \mu\text{g/mL}$. No ensaio ABTS apresentou significativa inibição de radicais com taxa máxima de eliminação de $93,60 \pm 2,46\%$ (BARBOSA, 2017).

Os monoterpenos α -pineno e β -pineno são relatados na literatura científica com propriedade antioxidante, podendo essa ser exercida por esses compostos de forma separada ou em sinergia com outros pinenos (MERCIER *et al.*, 2009).

4.6.2 Avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial e da microemulsão de *Pectis brevipedunculata*

A atividade antioxidante do óleo essencial (OE-PB) e microemulsão (ME-PB) de *Pectis brevipedunculata*, e seu branco (ME-BRANCO) realizada pelo método DPPH com os resultados expressos em TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), capacidade antioxidante total do composto equivalente ao trolox, são apresentados na Tabela 21.

A curva de calibração do trolox por DPPH é a apresentada na Figura 28 e a variação da absorbância em relação à concentração é representada pela equação da reta, equação 7.

Tabela 21 - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox no óleo essencial (OE-PB) e microemulsão (ME-PB) de *Pectis brevipedunculata*, e seu branco (ME-BRANCO) pelo método DPPH.

Amostras	Atividade antioxidante ($\mu\text{MTrolox/g}$)* DPPH
OE-PB	$1.030 \pm 12,05^a$
ME-PB	$1.503 \pm 84,6^b$
ME-BRANCO	$346,40 \pm 30,81^c$

Fonte: Autora (2024).

Nota: * Valores das médias das triplicatas $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste Anova two-way com comparação de Tukey ($p \leq 0,05$).

O OE-PB alcançou concentrações de antioxidantes na ordem de $1.030 \mu\text{MTrolox/g}$. A ME-PB indicou $1.503 \mu\text{M}$ de Trolox por grama da amostra. E o ME-BRANCO obteve valor inferior em relação as demais amostras analisadas, de $346,40 \mu\text{MTrolox/g}$ (Tabela 21). A otimização da atividade antioxidante na ME é visualizada pelo aumento da concentração de antioxidantes na amostra, quando comparada ao OE sem ser incorporado. Como mencionado na subseção anterior, esta atividade está sendo realizada pelos constituintes do OE inseridos no sistema e não pelos demais componentes da formulação, os tensoativos, pois a concentração de antioxidantes gerados pelo ME-BRANCO foi consideravelmente menor.

A capacidade antioxidante total dos compostos equivalentes ao trolox pelo método ABTS rendeu a concentração de $972,40 \mu\text{MTrolox/g}$ ao OE-PB, $1.209 \mu\text{MTrolox/g}$ à ME-PB

e 394,80 $\mu\text{MTrolox/g}$ ao ME-BRANCO (Tabela 22). Nota-se que independentemente do método de captura de radicais livres, seja DPPH ou ABTS, a ME desempenha atividade antioxidante melhor que o OE, rendendo valores superiores das concentrações destes compostos.

A curva de calibração do trolox por ABTS é a apresentada na Figura 29. A variação da absorbância em relação à concentração é representada pela equação da reta, equação 8.

Tabela 22 - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox no óleo essencial (OE-PB) e microemulsão (ME-PB) de *Pectis brevipedunculata*, e seu branco (ME-BRANCO) pelo método ABTS.

Amostras	Atividade antioxidante ($\mu\text{MTrolox/g}$)* ABTS
OE-PB	972,40 $\pm$ 16,89 ^a
ME-PB	1.209 $\pm$ 1,48 ^b
ME-BRANCO	394,80 $\pm$ 24,79 ^c

Fonte: Autora (2024).

Nota: * Valores das médias das triplicatas $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste Anova two-way com comparação de Tukey ($p \leq 0,05$).

OEs da família Asteraceae, como *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers., *Eupatorium ballotifolium* Kunth e *Vernonia chalybaea* Mart. ex DC. apresentaram atividade antioxidante verificadas pelo método DPPH e pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico. Todos os óleos exibiram capacidade antioxidante por ambos os métodos. O ensaio de eliminação de radicais livres de DPPH alcançou valores de CI_{50} de 49,0 mg/mL; 222,17 $\mu\text{g/mL}$; e 249,68 $\mu\text{g/mL}$ para os OEs de *B. trinervis*, *E. ballotifolium* e *V. chalybaea*, respectivamente. A melhor ação antioxidante foi observada pelo ensaio β -caroteno/ácido linoleico, com valores de CI_{50} de 28,87 $\mu\text{g/mL}$; 19,47 $\mu\text{g/mL}$ e 35,87 $\mu\text{g/mL}$ para os OEs de *B. trinervis*, *E. ballotifolium* e *V. chalybaea*, respectivamente. Timol e carvacrol foram usados como padrões do controle positivo (SOBRINHO, 2016).

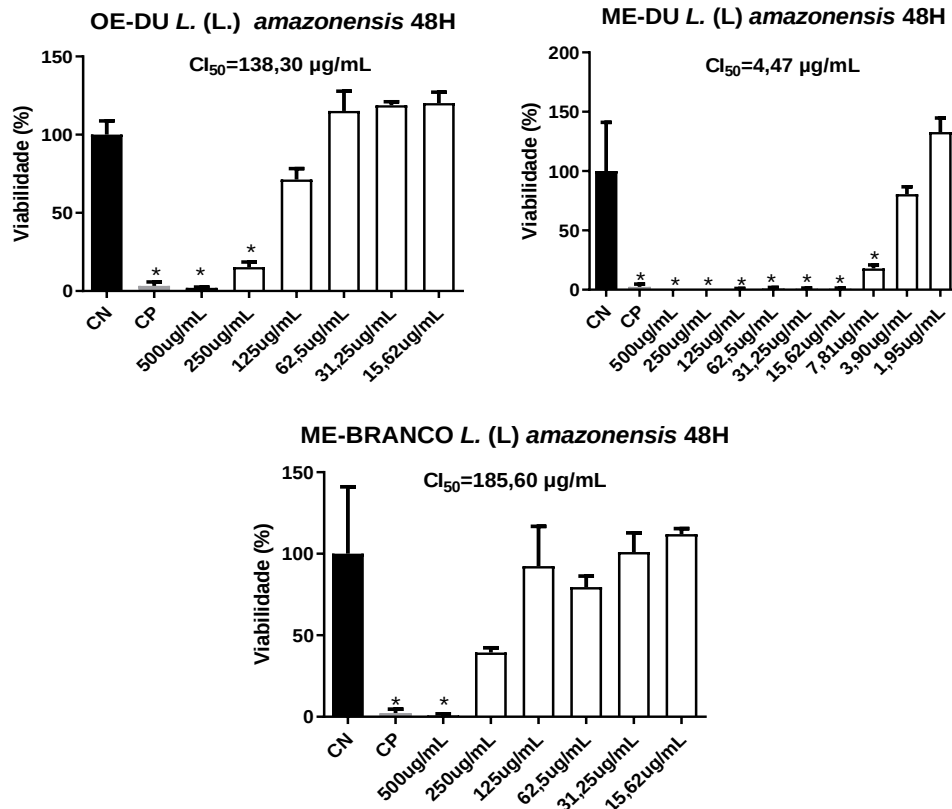
Não estão disponíveis na literatura dados extensos sobre a atividade antioxidante de espécies do gênero *Pectis*. Tem-se informações sobre a espécie *Pectis elongata* Kunth, que apresenta entre seus constituintes em maiores teores o geranial e o neral e que a atividade antioxidante do OE desta espécie foi avaliada pelo método DPPH, apresentando valor de CE_{50} de 21.644,72 $\mu\text{g/mL}$, sendo este valor elevado em relação aos padrões quercetina (64,13 $\mu\text{g/mL}$) e ácido ascórbico (98,35 $\mu\text{g/mL}$) testados. Portanto, a espécie não tem potencial de atividade antioxidante (SILVA *et al.*, 2021). Acrescenta-se que o citral, formado pelos majoritários identificados na espécie, geranial e neral, tem capacidade comprovada de realizar varredura *in vitro* do radical DPPH ($\text{CI}_{50} = 25,32 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$) (TOSCAN, 2010).

4.7 Atividade leishmanicida dos óleos essenciais e microemulsões contra *Leishmania* (L.) *amazonensis*

4.7.1 Atividade leishmanicida do óleo essencial e da microemulsão de *Duguetia stelechantha* contra *Leishmania* (L.) *amazonensis*

A atividade antileishmaniana do OE-DU contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis* causou 50% de inibição do crescimento do parasito (CI_{50}) na concentração de 138,30 $\mu\text{g/mL}$. A formulação ME-DU apresentou CI_{50} inferior ao do OE-DU, de 4,47 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 30). Portanto, para a ME-DU inativar a mesma quantidade de *L. (L.) amazonensis* que o OE-DU, necessita-se de uma dose cerca de 30 vezes menor que este óleo. O valor do CI_{50} da ME-DU é próximo ao identificado para a droga padrão utilizada como controle positivo neste estudo, a Pentamidina, com $CI_{50} = 4,00 \mu\text{g/mL}$. Assim, ME-DU apresentou uma ação antileishmaniana mais eficiente que o OE-DU, devido à menor concentração para inibição do crescimento do parasito.

Figura 30 - Viabilidade de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratados por 48 horas com o óleo essencial extraído de *Duguetia stelechantha* (OE-DU), com a microemulsão preparada com este óleo (ME-DU) e com o branco da microemulsão (ME-BRANCO).

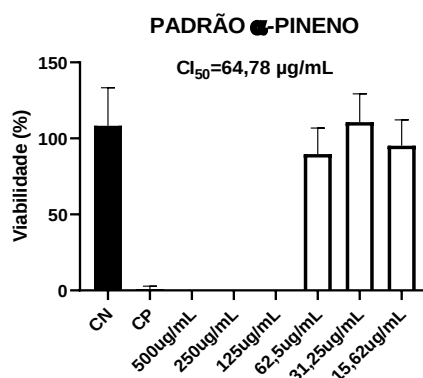


Fonte: Autora (2024).

Nota: CN = controle negativo; CP = controle positivo; *Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo em $p < 0,05$.

O branco da microemulsão (ME-BRANCO) obteve o maior valor de CI_{50} , de 185,60 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 30) quando comparado com OE-DU e ME-DU. O padrão do composto α -pineno, um dos constituintes majoritários do OE-DU, também foi testado e apresentou CI_{50} de 64,78 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 31).

Figura 31 - Viabilidade de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratados por 48 horas com o padrão α -pineno.



Fonte: Autora (2024).

Nota: CN = controle negativo; CP = controle positivo; *Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo em $p < 0,05$.

O valor do CI_{50} classifica uma amostra em relação à eficiência da sua atividade. A amostra é considerada ativa contra formas promastigotas de *Leishmania* quando o CI_{50} for igual ou inferior a 100 $\mu\text{g/mL}$, é moderadamente ativa quando a concentração inibitória for entre 101 e 200 $\mu\text{g/mL}$ e é inativa quando for maior que 200 $\mu\text{g/mL}$ (MOTA *et al.*, 2016). Portanto, OE-DU é classificado como moderadamente ativo.

Na literatura consta OEs de *Duguetia* com atividade antiprotozoários comprovada, como por exemplo o OE obtido de *Duguetia quitarensis*, que apresenta ação contra *Trypanosoma cruzi*, com um CI_{50} de 0,54 $\mu\text{g/mL}$ (BAY *et al.*, 2019). Da mesma forma, diferentes espécies da Família Annonaceae têm sido relatadas como biologicamente ativas (SANTOS *et al.*, 2022). A espécie *Annona foetida*, por exemplo, proporciona OE a partir das folhas com atividade antileishmania para vários tipos desses protozoários (*L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *L. guvanensis*) (COSTA *et al.*, 2009).

Os terpenos, presentes nos OEs, desempenham mecanismos de ação que permitem sua interação com a membrana plasmática do parasito, dessa forma os compostos alteram a permeabilidade da membrana celular e sua composição. Todas essas modificações ocasionam desequilíbrios eletrolíticos, induzindo a lise celular. Os terpenos também interferem em organelas como o núcleo e as mitocôndrias, gerando estresse oxidativo, suprimem moduladores

de proliferação celular e inibem enzimas (SAKYI *et al.*, 2021; HELLMANN *et al.*, 2018; MENEGUETTI *et al.*, 2015).

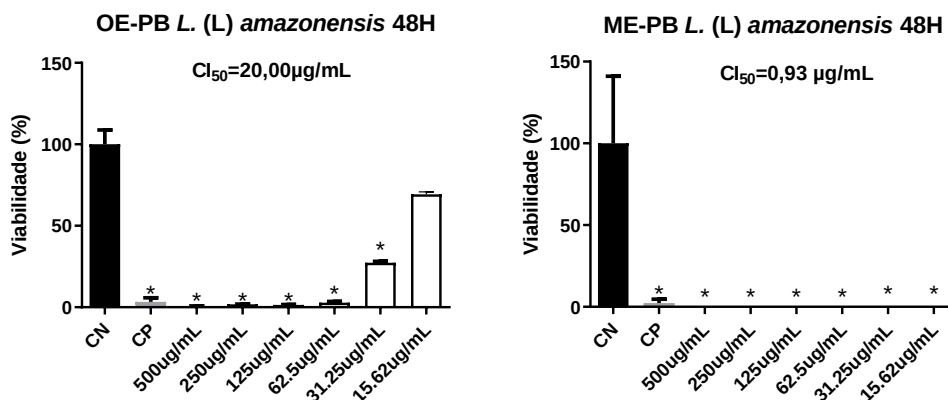
No presente estudo, o efeito antileishmania do OE-DU foi menos eficaz que a droga padrão Pentamidina®, embora isso possa ser revertido usando formulações, como as microemulsões, que otimizam os resultados das atividades biológicas. Nesse sentido, a biotecnologia tem permitido o desenvolvimento de técnicas de proteção de compostos, que oferecem maior estabilidade e biodisponibilidade dos princípios ativos (LIMA *et al.*, 2017).

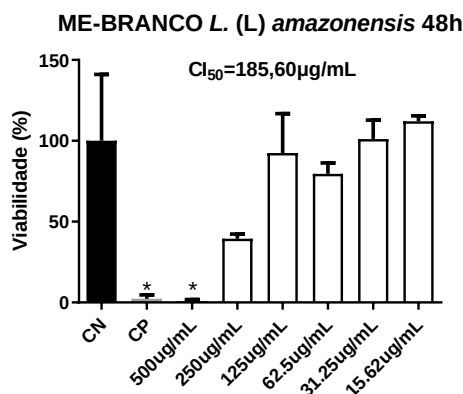
A ME-DU aqui formulada é configurada como uma amostra ativa, enquanto o branco da microemulsão classificado como moderadamente ativo. Isso indica que a atividade antileishmania da ME-DU está sendo realizada pela biodisponibilidade dos princípios ativos do óleo incorporado na formulação da ME, e não pelos tensoativos empregados.

4.7.2 Atividade leishmanicida do óleo essencial e da microemulsão de *Pectis brevipedunculata* contra *Leishmania (L.) amazonensis*

O OE-PB apresentou atividade leishmanicida com concentração inibitória (CI_{50}) de 20,00 μ g/mL contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. A ME-PB apresentou CI_{50} de 0,93 μ g/mL (Figura 28), o que significa que a atividade da ME-PB é em torno de 20 vezes superior à do OE-PB. A ME-PB ainda apresentou resultados mais satisfatórios em relação à droga padrão utilizada como controle positivo, a Pentamidina®, que apresenta CI_{50} de 4 μ g/mL. O ME-BRANCO apresentou um CI_{50} de 185,60 μ g/mL (Figura 32).

Figura 32 - Viabilidade de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratados por 48 horas com óleo essencial extraído de *Pectis brevipedunculata* (OE-PB) e sua microemulsão (ME-PB) comparada ao branco da microemulsão (ME-BRANCO).





Fonte: Autora (2024).

Nota: CN = controle negativo; CP = controle positivo; *Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo em $p < 0,05$.

O valor do CI_{50} classifica as amostras em ativas quando o CI_{50} for igual ou inferior a $100\mu\text{g/mL}$; amostras moderadamente ativas, quando o CI_{50} variar de 101 a $200\mu\text{g/mL}$; e amostras inativas, quando o CI_{50} for superior a $200\mu\text{g/mL}$ (MOTA *et al.*, 2016). Assim, o OE-PB e a ME-PB são definidas como amostras ativas, e o ME-BRANCO como moderadamente ativo.

A concentração inibitória do ME-BRANCO foi maior que a do OE-PB e ME-PB, sinalizando que os tensoativos utilizados na microemulsão não foram responsáveis pela inibição do parasito, significando ainda que a atividade leishmanicida da ME-PB é realizada pelos princípios ativos do OE, que se tornaram mais biodisponíveis e estáveis quando incorporados à formulação da ME-PB.

OEs de várias espécies pertencentes a diferentes gêneros da família Asteraceae contém princípios ativos eficientes contra *Leishmania amazonensis* como os dispostos em *P. brevipedunculata*, a exemplos do OE de *Vanillosmopsis arborea*, com CI_{50} de $7,35\mu\text{g/mL}$, ativa contra promastigotas (COLARES *et al.*, 2013), OE extraído de folhas e flores de *Achillea millefolium*, com CI_{50} de $7,80\mu\text{g/mL}$, OE extraído das flores de *Matricaria recutita*, que apresenta CI_{50} de $10,80\mu\text{g/mL}$, OE extraído de folhas de *Vernonia brasiliiana*, com CI_{50} de $213,00\mu\text{g/mL}$, enquanto OE extraído de flores apresentou CI_{50} de $112,00\mu\text{g/mL}$ e das raízes, um CI_{50} $109\mu\text{g/mL}$ (SILVA *et al.*, 2020).

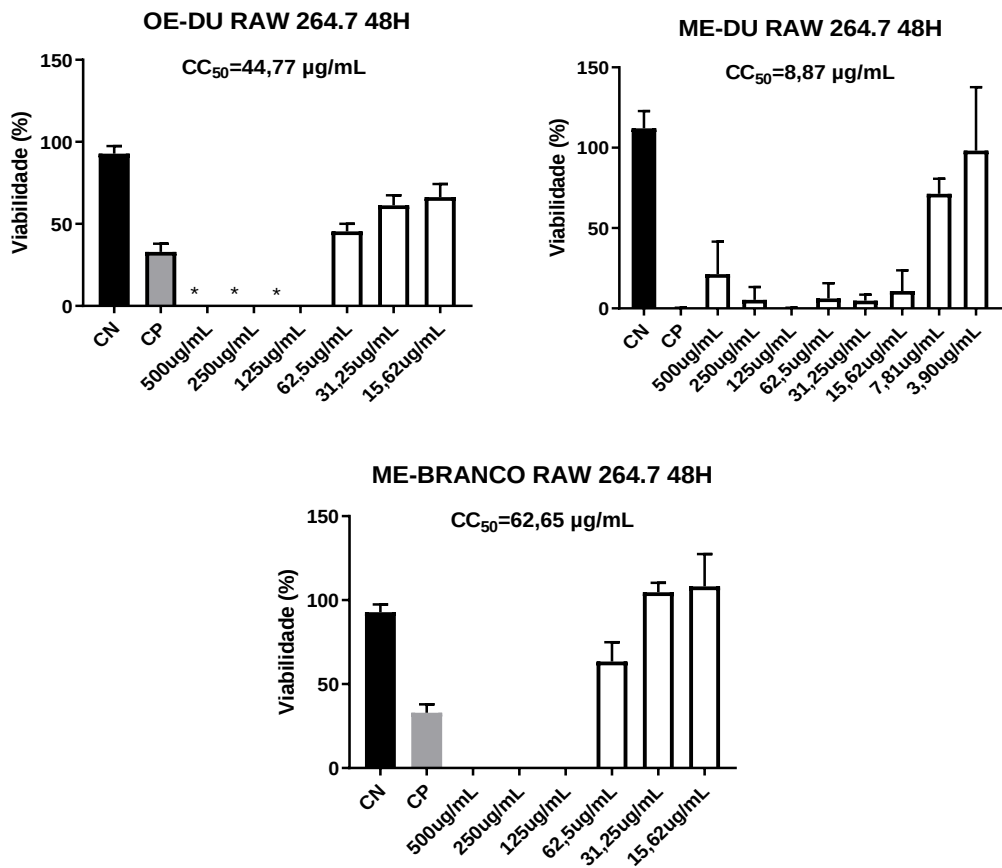
Compostos presentes nesses OEs, como os terpenos, originam um mecanismo de ação que núcleo e as mitocôndrias, interagem e modificam a composição e a permeabilidade da membrana celular do parasito, causando desregulação de nutrientes e divisão celular, podendo levar à morte celular (SAKYI *et al.*, 2021; HELLMANN *et al.*, 2018).

4.8 Citotoxicidade dos óleos essenciais e microemulsões em células RAW 264.7

4.8.1 Citotoxicidade do óleo essencial e da microemulsão de *Duguetia stelechantha* em células RAW 264.7

O OE-DU apresentou uma concentração citotóxica (CC₅₀) de 44,77 µg/mL contra células RAW 264.7, enquanto a ME-DU apresentou CC₅₀ de 8,87 µg/mL e o ME-BRANCO de 62,65 µg/mL (Figura 33). Quando o CC₅₀ é igual ou inferior a 100 µg/mL, as amostras são definidas como citotóxicas (SILVA-SILVA, 2016). Portanto, o OE-DU, a ME-DU e o ME-BRANCO são considerados citotóxicos contra células RAW 264.7.

Figura 33 - Atividade citotóxica do óleo essencial (OE-DU) extraído de *Duguetia stelechantha*, da microemulsão preparada com esse óleo (ME-DU) e do branco da microemulsão (ME-BRANCO) contra macrófagos RAW 264.7.



Fonte: Autora (2024).

Nota: CN = controle negativo; CP = controle positivo; *Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo em $p < 0,05$.

O índice de seletividade (I.S) indica se uma amostra apresenta maior toxicidade contra o parasito ou para a célula. Quando o I.S. for maior que 1 significa que a amostra apresenta

maior toxicidade para o parasito. E quando o I.S. for menor de 1 resulta que a amostra tem maior toxicidade para a célula (SILVA-SILVA, 2016).

O OE-DU apresentou um CI_{50} superior ao CC_{50} (Tabela 23), alcançando um I.S inferior a 1 (0,32), o que indica que este óleo é mais tóxico para as células do que para o parasito, e pode causar a ruptura celular. O ME-BRANCO, assim como o OE-DU, também apresentou um I.S inferior a 1 (0,34) (Tabela 23), indicando maior citotoxicidade em relação à toxicidade parasitária. Dessa forma, o OE-DU e o ME-BRANCO apresentam baixa seletividade para *L. (L.) amazonensis*.

A ME-DU exibiu um CI_{50} inferior ao CC_{50} , gerando em um I.S maior que 1 (1,98) (Tabela 23), demonstrando que a ME-DU é mais seletiva para a inibição do parasito. Como relatado, a concentração inibitória da ME-DU indicada para *L. (L.) amazonensis* é inferior ao considerado citotóxico, assim infere-se que o uso do OE de *D. stelechantha* quando associado à ME contra o protozoário estudado é seguro.

A pentamidina, utilizada como fármaco de referência no ensaio antileishmania, apresenta $CC_{50}=15,24 \mu\text{g/mL}$ (FIGUEREDO, 2021) e $CI_{50}=4,00 \mu\text{g/mL}$. Assim, a droga padrão apresenta I.S = 3,81, sendo este valor maior que 1, a pentamidina, assim como a ME-DU, é mais seletiva para a inibição do parasito do que para a destruição celular.

Tabela 23 - Valores da concentração de inibição (CI_{50}), concentração citotóxica (CC_{50}) e índice de seletividade (I.S) do óleo essencial (OE-DU) de *Duguetia stelechantha*, da microemulsão preparada com este óleo (ME-DU) e do branco da microemulsão (ME-BRANCO).

AMOSTRAS	PROMASTIGOTAS <i>L. (L.) amazonensis</i> CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CÉLULAS RAW 264.7 CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	I.S
OE-DU	138,30	44,77	0,32
ME-DU	4,47	8,87	1,98
ME-BRANCO	185,60	62,65	0,34

Fonte: Autora (2024).

A citotoxicidade do OE-DU contra células RAW 264.7 era esperada, pois o caráter lipofílico dos terpenos presentes nos OEs pode interagir com componentes da membrana celular, resultando em modificações na permeabilidade e integridade desta membrana, na capacidade osmorregulatória da célula, pode ainda gerar abertura da camada fosfolipídica, perdendo conteúdo interior e causar morte celular (NOGUEIRA, 2019). Da mesma forma, esperava-se que o ME-BRANCO apresentasse caráter citotóxico, pois os tensoativos utilizados nos sistemas microemulsionados também podem interagir com os componentes da membrana celular, rompendo a camada de fosfolipídios, podendo ocasionar a ruptura da estrutura (BRAGA, 2002 apud ROMANELLI, 2004). Segundo Brustolin *et al.* (2022), a citotoxicidade

de amostras lipofílicas, como os OEs, não deve ser considerada uma limitação para uso, pois a afinidade da amostra lipofílica com a membrana plasmática da célula pode influenciar significativamente a citotoxicidade identificada.

Apesar da baixa seletividade do OE-DU para o parasito avaliado, os OEs, em geral, têm capacidade para combater *Leishmania*. O potencial anti-leishmania de aproximadamente 35 OEs de plantas contra *Leishmania amazonensis* foi pesquisado, resultando que 45,7% destes OEs exibem $10 < CI_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$ (SILVA *et al.*, 2020). Com isso, infere-se que as formulações incorporando o OE-DU são estratégias para obter maior seletividade do OE contra o parasito e menor para as células, pois as formulações como as microemulsões diminuem a toxicidade de compostos, além de torná-los mais biodisponíveis e estáveis, conferindo otimização da atividade biológica.

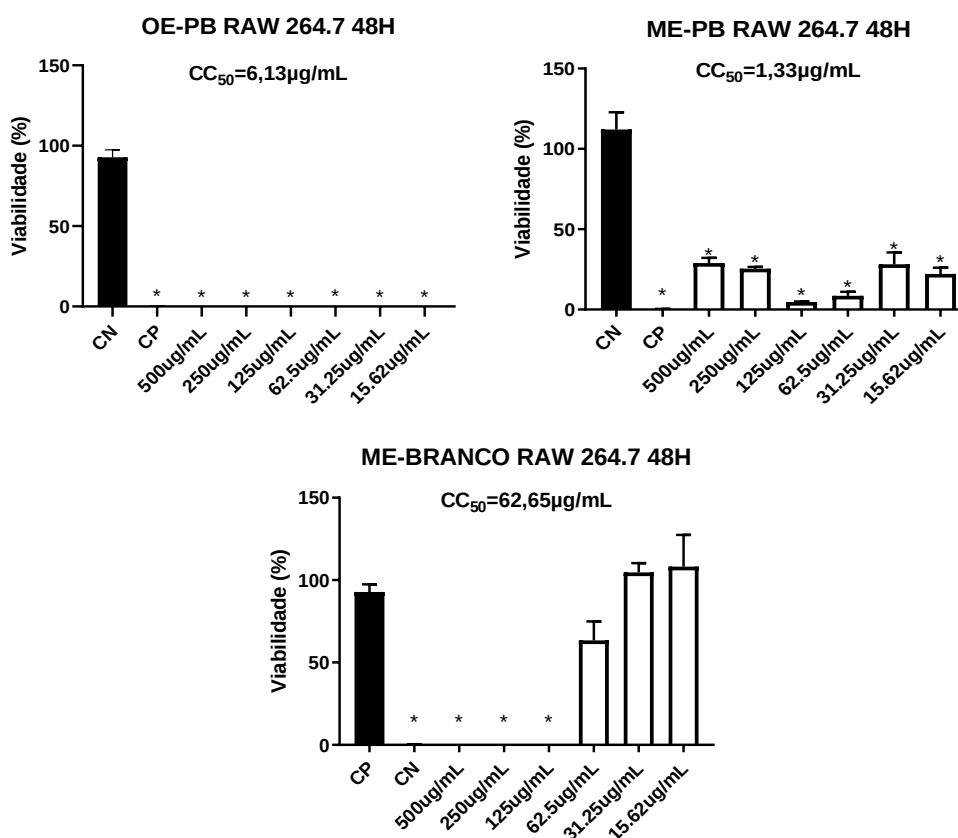
Os resultados da atividade leishmanicida do óleo essencial e da microemulsão de *Duguetia stelechantha* contra *L. (L.) amazonensis* e da citotoxicidade em células RAW 264.7, assim como a caracterização química e físico-química do óleo essencial da espécie e da microemulsão foram publicado no periódico **Industrial Crops and Products**, qualis A1:

BARATA LOPES, A. C. C.; CAMARA, M. B.P.; LIMA, A. S.; NASCIMENTO, M. O.; XAVIER, J. K. A. M.; JESUS, C. M.; MENDONÇA, C.J.S.; CARVALHO, A. L. M.; SILVA, L. A.; ROCHA, CLÁUDIA Q. Chemical composition and potential antileishmanial and cytotoxic activity of *Duguetia stelechantha* (Diels) R.E.Fr. essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 202, 2023, ISSN 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116978> (**Anexo A**) (BARATA LOPES *et al.*, 2023).

4.8.2 Citotoxicidade do óleo essencial e da microemulsão de *Pectis brevipedunculata* em células RAW 264.7

A concentração citotóxica (CC₅₀) do OE-PB para células RAW 264.7 foi determinada em 6,13µg/mL. A ME-PB obteve CC₅₀ de 1,33µg/mL e o ME-BRANCO CC₅₀ de 62,65µg/mL (Figura 34). Amostras com CC₅₀ igual ou inferior a 100µg/mL são classificadas como citotóxicas (SILVA-SILVA, 2016). Assim, as amostras de OE-PB, ME-PB e ME-BRANCO são consideradas citotóxicas contra a linhagem celular analisada.

Figura 34 - Atividade citotóxica do óleo essencial (OE-PB) extraído de *Pectis brevipedunculata*, da microemulsão preparada com esse óleo (ME-PB) e do branco da microemulsão (ME-BRANCO) contra macrófagos RAW 264.7.



Fonte: Autora (2024).

Nota: CN = controle negativo; CP = controle positivo; *Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo em $p < 0,05$.

A determinação do I.S do OE-PB para representar a maior toxicidade da amostra contra parasitos ou linhagens celulares gerou valor inferior a 1 (0,30), pois a concentração inibitória (CI₅₀) foi superior à concentração celular tóxica (CC₅₀) determinada (Tabela 24). Tal resultado significa que o OE-PB é mais tóxico para a linhagem celular que para o parasito, demonstrando seletividade de ruptura celular.

Tabela 24 - Valores da concentração inibitória (CI₅₀), concentrações citotóxicas (CC₅₀) e índice de seletividade (I.S) do óleo essencial extraído de *Pectis brevipedunculata* (OE-PB), sua microemulsão (ME-PB) e o branco (ME-BRANCO) contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e a linhagem de células RAW 264.7.

AMOSTRAS	PROMASTIGOTAS <i>L. (L.) amazonensis</i> CI ₅₀ (µg/mL)	CÉLULAS RAW 264.7 CC ₅₀ (µg/mL)	I.S
OE-PB	20,00	6,13	0,30
ME-PB	0,93	1,33	1,43
ME-BRANCO	185,60	62,65	0,34

Fonte: Autora (2024).

A ME-PB apresentou I.S superior a 1 (1,43), indicando que a ME analisada é mais seletiva para inibição do parasito e menos tóxico para as células. O que justifica o uso da formulação ME-PB contra *Leishmania*, pois o CI_{50} para esse protozoário foi inferior à CC_{50} para as células RAW 264.7 (Tabela 24). O ME-BRANCO também apresentou um I.S menor que 1 (0,34), semelhante ao OE-PB, indicando maior toxicidade celular contra *L. (L.) amazonensis*.

A pentamidina, utilizada como controle positivo no teste antileishmania, apresenta $CC_{50}=15,24 \mu\text{g/mL}$ (FIGUEREDO, 2021) e $CI_{50}=4,00 \mu\text{g/mL}$. Assim, o fármaco de referência apresenta I.S = 3,81, sendo este valor maior que 1, a pentamidina, assim como a ME-DU, é mais seletiva para inibir o parasito do que para causar toxicidade à célula.

As toxicidades desempenhadas pelo OE-PB e ME-PB para as células eram previstas, pois a composição química dos OEs, constituída pelos terpenos, assim como os tensoativos empregados nas formulações de ME, são conhecidos por modificar as estruturas e composições das membranas citoplasmáticas dos microorganismos, interferindo sua permeabilidade e ocasionando a ruptura celular (HAMMER *et al.*, 2000).

Pelos resultados obtidos, infere-se que o OE-PB incorporado a um sistema microemulsionado é seguro para uso contra o protozoário *L. (L.) amazonensis*, pois possibilita maior biodisponibilidade dos princípios ativos e potencializa os efeitos deles, otimizando atividades leishmanicidas.

Os resultados da atividade leishmanicida do óleo essencial e da microemulsão de *Pectis brevipedunculata* contra *L. (L.) amazonensis* e da citotoxicidade em células RAW 264.7, assim como a caracterização química e físico-química do óleo essencial da espécie e da microemulsão foram publicados no periódico **Pharmaceutics**, qualis A1: BARATA LOPES, A. C. C.; NASCIMENTO, J. R.; CAMARA, M. B. P.; LIMA, A. S.; LOPES, G. L.N.; DO NASCIMENTO, MA. O.; XAVIER, J. K.A.M.; DE JESUS, C. M.; MENDONÇA, C. D.J.S.; CARVALHO, A. L.M.; SILVA, L. A.; **ROCHA, C. Q.** Chemical Characterization, Leishmanicidal Activity and In Vitro Cytotoxicity of the Essential Oil Extracted from *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip. and Its Incorporation into Microemulsion Systems. *Pharmaceutics*, v.16, n.87, 2024. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16010087> (**Anexo B**) (BARATA LOPES *et al.*, 2024).

4.9 Aplicação dos óleos essenciais e microemulsões em morangos

O alimento selecionado para aplicação dos óleos essenciais e microemulsões por imersão foi o morango. A escolha por este fruto foi baseada na característica de que este apresenta uma predisposição à ataques por bolores e leveduras. Fatores como elevados teores de açúcares e demais nutrientes; atividade de água ideal para crescimento microbiano; baixo pH; apresentam uma camada superficial frágil, que pode ser danificada com certa facilidade, possibilitam o surgimento e crescente desenvolvimento de bolores e leveduras (VU *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2019). Em virtude desses fatores, há uma necessidade de buscar novos agentes de proteção para esse alimento.

4.9.1 Aplicação do óleo essencial e da microemulsão de *Duguetia stelechantha* em morangos

O pH, teor de sólidos solúveis em °BRIX e a umidade dos morangos foram verificados no tempo 0 e com 15 dias após a aplicação das amostras (Tabela 25). No tempo 0, o pH do morango não sanitizado foi 3,24, sendo definido como de caráter ácido, e este valor manteve-se por todo o período de avaliação. O grupo de morangos sanitizados e os que receberam a aplicação do óleo essencial e da microemulsão de *Duguetia stelechantha* apresentaram após 15 dias valores de pH um pouco acima do valor citado, 3,47; 3,78 e 3,76, respectivamente, mas permaneceram com a acidez característica do fruto. De acordo com a Instrução Normativa nº 37 de 01/10/2018 do Ministro da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a polpa de morango, definida como a parte comestível do fruto, deve apresentar pH = 3,30 (BRASIL, 2018). E de acordo com a *Food and Drugs Administration* (FDA), a porção comestível do morango no seu estado normal e natural, deve indicar pH entre 3,00 e 3,90 (FDA/CFSAN, 2008). Portanto, este parâmetro não foi alterado significativamente com a aplicação do OE-DU e ME-DU, permanecendo de acordo com o esperado.

Duran *et al.* (2016) também observaram o aumento do pH em morangos revestidos com quitosana, natamicina, nisina, extrato de romã e extrato de semente de uva. Os pesquisadores justificam a elevação do pH devido à utilização de ácidos orgânicos durante a respiração no período de armazenamento. Os morangos não revestidos apresentaram pH de 3,33 a 3,56, enquanto os morangos com revestimento tiveram pH de 3,33 a 3,49.

Tabela 25 - pH, teor de sólidos solúveis em °BRIX e umidade dos morangos antes e após aplicação do óleo essencial (OE-DU) e da microemulsão (ME-DU) de *Dugetia stelechantha*.

TEMPO	AMOSTRAS	pH	°BRIX	UMIDADE
0 dia	MORANGO NÃO SANITIZADO	3,24 ± 0,01	5,30 ± 0	90,85% ± 0,02
	MORANGO NÃO SANITIZADO	3,24 ± 0,03	5,00 ± 0,01	89,18% ± 0,01
	MORANGO SANITIZADO	3,47 ± 0,02	5,00 ± 0,02	89,49% ± 0,01
15 dias	OE-DU	3,78 ± 0,01	6,10 ± 0,03	91,13% ± 0,02
	ME-DU	3,76 ± 0,01	10,00 ± 0,02	88,10% ± 0,02
	ME-BRANCO	3,71 ± 0,02	10,20 ± 0,01	88,85% ± 0,03

Fonte: Autora (2024).

O teor de sólidos solúveis dos morangos, expresso como °Brix, foi de 5,30 para o morango não sanitizado no tempo 0. A IN n°37 do MAPA (BRASIL, 2018) estabelece 6,50°BRIX para a polpa do morango, sendo este um valor não tão distante do encontrado no presente trabalho. Após o período de 15 dias, o teor de sólidos solúveis dos morangos foi reduzido para 5,00°BRIX. No último tempo de observação, o morango sanitizado também apresentou 5,0°BRIX e os grupos de morangos que foram imersos no OE-DU, ME-DU e ME-BRANCO apresentaram valores mais elevados de sólidos solúveis totais, de 6,10; 10,00 e 10,20°BRIX, respectivamente (Tabela 25).

Duran *et al.* (2016) também notaram que o grupo controle apresentou uma redução no teor de sólidos totais durante o armazenamento, de 10,86° para 8,22°BRIX. A redução desse parâmetro foi maior no grupo controle do que nos demais grupos com revestimentos. Com base em Aday e Caner (2013), Duran *et al.* (2016) explicam que nos frutos não revestidos a hidrólise da sacarose, que ocorre a fim de manter a atividade fisiológica, desenvolveu-se com uma velocidade maior, do que nos grupos dos morangos revestidos, e por consequência tem-se a diminuição dos sólidos solúveis. Duran *et al.* (2016) ainda verificaram que durante os 5 primeiros dias de armazenamento os morangos revestidos com quitosana e extrato de romã apresentaram aumento do teor de sólidos solúveis, de 10,86° para 10,94°BRIX, como nos frutos da aplicação do OE-DU, ME-DU e ME-BRANCO do presente trabalho.

O teor de umidade do morango no tempo 0 foi de 90,85%. O valor encontrado foi próximo ao estabelecido na Tabela Brasileira da Composição dos Alimentos (TACO, 2011), que é de 91,50%. Ao final dos tempos de avaliação, a umidade do fruto reduziu-se em todos os grupos, com exceção dos morangos da aplicação do OE-DU, que elevou-se para 91,13%. O menor teor de umidade (88,10%) foi observado no grupo onde aplicou-se a ME-DU e em sequência o grupo que recebeu o ME-BRANCO, com 88,85% de umidade (Tabela 25).

A perda de peso dos morangos foi progressiva, ou seja, com o passar dos dias os frutos de todos os grupos foram reduzindo cada vez mais suas massas, conforme mostra a Tabela 26.

Nota-se que no período de avaliação, os grupos de morangos não sanitizados e de morangos com a aplicação do ME-BRANCO perderam uma quantidade de massa superior à dos demais grupos, alterando de 0,14% para 4,32% e 0,47% para 4,89% de peso perdido, respectivamente. Sendo assim, os morangos da aplicação do OE-DU e ME-DU perderam menos peso que os morangos do grupo controle. Os revestimentos em frutos exercem o papel de uma camada extra, que reveste os estômatos, causando uma redução na transpiração e, por consequência uma redução na perda de peso (GUERREIRO *et al.*, 2015), o que foi notado quando compara-se o grupo da aplicação do ME-DU com o grupo dos morangos não sanitizados.

Tabela 26 - Perda de peso dos morangos após aplicação do óleo essencial (OE-DU) e da microemulsão (ME-U) de *Duguetia stelechantha*.

TEMPO	AMOSTRAS				
	MORANGO NÃO SANITIZADO	MORANGO SANITIZADO	OE-DU	ME-DU	ME-BRANCO
3 DIAS	0,14%	0,13%	0,16%	0,78%	0,47%
7 DIAS	2,05%	0,34%	0,77%	1,70%	1,17%
10 DIAS	2,08%	0,86%	0,91%	2,23%	1,84%
15 DIAS	4,32%	0,97%	1,16%	2,48%	4,89%

Fonte: Autora (2024).

Khan *et al.* (2019), em um estudo com revestimento comestível antimicrobiano com base em quitosana, também concluíram que a % de perda de peso de morangos, do grupo controle e de morangos com revestimentos comestíveis a base de quitosana, aumentou com o período de armazenamento, chegando a 2,02% e 1,37%, respectivamente, ao final do armazenamento de 8 dias. Guerreiro *et al.* (2015) estudando revestimentos comestíveis à base de polissacarídeos, alginato de sódio e pectina, enriquecidos com constituintes de óleos essenciais, citral e eugenol, verificaram que a perda de peso de morangos aumentou em todas os tratamentos durante o armazenamento de 14 dias a 0,5°C. O controle perdeu 4,60% com 14 dias de armazenamento. Nos revestimentos com as variadas formulações com os polissacarídeos, incluindo proporções diferentes de citral e eugenol, foi possível observar perda de peso de 4,00% até 9,90%.

Os morangos foram examinados em relação à decadência visual, onde foram definidos como deteriorados aqueles que apresentaram lesão visível, de cor escura, que segundo Khan *et al.* (2019), caracteriza área infectada por microrganismos. Observou-se ainda a modificação da textura causando perda de firmeza e a presença de infecção fúngica aparente (Figura 35). Notou-se que com 3 dias de análise, o grupo de morangos que não foram sanitizados e os que foram sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm começaram a apresentar

injúrias na estrutura do fruto, destacando-se a mudança para coloração escura e a modificação da textura, gerando uma taxa de apodrecimento de 50,0% para o grupo dos não sanitizados e taxa de 16,67% para o grupo dos sanitizados. Na avaliação com 7 dias percebeu-se que essas lesões progrediram, elevando a taxa de apodrecimento dos respectivos grupos para 75,00% e 50,00%. Com 10 dias, além dessas alterações, esses grupos apresentaram ainda proliferação de fungos nos frutos, ocasionando o apodrecimento de 100,00% dos morangos que não foram sanitizados e 66,67% dos morangos higienizados. No último tempo do experimento, com 15 dias, um número maior de morangos desse último grupo apresentou infecção fúngica, chegando a 83,33% de deterioração (Tabela 27).

Figura 35 - Grupo de morangos no dia do procedimento da sanitização com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm (A) e após 15 dias (B), evidenciando a decadência visual (C) e infecção fúngica aparente (D).



Fonte: Autora (2024).

Khan *et al.* (2019) em estudo sobre deterioração em morangos, observaram que após 4 dias de armazenamento a 10°C, morangos do grupo controle apresentaram sinais de infecção fúngica. O percentual de deterioração visual aumentou com o passar do tempo e no final do experimento, com 8 dias, foi registrado 21,00% de infecção fúngica. No presente estudo, identificamos infecção fúngica a olho nu apenas no 10º dia de acompanhamento, mas ressalta-se que a temperatura de armazenamento utilizada foi inferior, de 5°C, o que pode ter colaborado para prolongar a vida de prateleira do fruto.

Os pesquisadores, Khan *et al.* (2019), ao compararam seus resultados com os de outros estudos, notaram diferentes taxas de decomposição e concluíram que a temperatura de armazenamento tem influência sobre a qualidade do fruto e consequentemente sobre o tempo de vida útil dos morangos.

Tabela 27 - Avaliação da decadência visual, infecção fúngica aparente e taxa de apodrecimento dos morangos após aplicação do óleo essencial (OE-DU) e microemulsão (ME-DU) de *Duguetia stelechantha*.

GRUPOS DE MORANGOS DA APLICAÇÃO	TEMPO 0	TEMPO 3 DIAS	TEMPO 7 DIAS	TEMPO 10 DIAS	TEMPO 15 DIAS
OE-DU	-	-	-	-	-
ME-DU	-	-	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura 25,00%	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura 25,00%	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura 25,00%
ME-BRANCO	-	-	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura 66,67%	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura 66,67%	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura 100,00%
MORANGO SANITIZADO	-	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura 16,67%	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura 50,00%	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura; Infecção fúngica aparente 66,67%	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura; Infecção fúngica aparente 83,33%
MORANGO NÃO SANITIZADO	-	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura 50,00%	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura 75,00%	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura; Infecção fúngica aparente 100,00%	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura; Infecção fúngica aparente 100,00%

Fonte: Autora (2024).

Os grupos da aplicação do ME-DU e ME-BRANCO apresentaram morangos que foram considerados deteriorados, em virtude do aparecimento de coloração escura e da perda de firmeza, causada pela modificação da textura de alguns dos frutos. 25,00% dos morangos que receberam ME-DU e 66,67% dos frutos da aplicação do ME-BRANCO desenvolveram essas características a partir do 7º dia do experimento. Na finalização do experimento, com 15 dias, 100,00% dos frutos da aplicação do ME-BRANCO apresentaram as mesmas alterações (Tabela 27). Ressalta-se que ainda com o surgimento dessas características, os morangos que receberam o ME-DU e ME-BRANCO não desenvolveram condições necessárias para a proliferação de fungos, do ponto de vista aparente. E a mesma conclusão faz-se aos morangos da aplicação do OE-DU, que não apresentaram nenhum sinal de decadência visual e de infecção fúngica visível.

Khan *et al.* (2019) concluíram também que morangos revestidos, com revestimento a base de quitosana, apresentaram menor deterioração do que os do grupo controle. Os morangos revestidos apresentaram sinais de decomposição a partir do 6º dia de armazenamento, enquanto no presente estudo tais sinais iniciaram-se no 7º dia.

Em relação à perda de firmeza dos frutos, Guerreiro *et al.* (2015) mencionam que esta tende a diminuir no período de armazenamento como consequência da degradação da parede celular e perda de turgor, e que este é um parâmetro de qualidade desejável para frutas frescas. Os pesquisadores verificaram que a aplicação de revestimentos a base polissacarídeos, alginato de sódio e pectina, e compostos presentes em óleos essenciais, citral e eugenol, melhoraram a firmeza de morangos em comparação ao grupo controle sem revestimento. No entanto, eles observaram que alguns compostos, como o citral, em altas concentrações (acima de 0,30%) reduzem a firmeza de frutos.

Os morangos que receberam a aplicação do OE-DU e ME-DU apresentaram uma mudança de coloração que foi observada no 3º dia de examinação. Esses frutos passaram a apresentar um vermelho menos intenso, e as folhas um verde com tonalidade mais escura (Figura 36). Essa tonalidade mais discreta do fruto não foi observada nos morangos do grupo do ME-BRANCO, o que pode justificar que a causa da alteração da cor foi o emprego do OE, contido também na ME, e não os tensoativos da ME.

Figura 36 - Grupo de morangos no dia do procedimento (A), com 3 (B), 7 (C), 10 (D) e 15 (E) dias após aplicação do óleo essencial (OE-DU) de *Duguetia stelechantha*.



Fonte: Autora (2024).

A mudança de coloração de morangos também foi notada por Horison *et al.* (2019), ao avaliarem o revestimento do fruto com nanoemulsão de óleo de semente de noz-moscada e quitosana, no entanto, a alteração observada foi da passagem do vermelho claro para o vermelho escuro, como denominado pelos pesquisadores. Horison *et al.* (2019) complementaram que mesmo com a incorporação no fruto, manteve-se a rigidez e a cor da pele após 5 dias de revestimento.

As antocianinas, que são os pigmentos responsáveis pela cor de morangos, apresentam variadas formas estruturais, o cátion flavilium, a base quinoidal, o carbinol pseudobase e a chalcona, que apresentam diferentes colorações. Essas estruturas podem ser afetadas por alguns fatores, como a temperatura, pH, presença de luz, oxigênio, enzimas e possíveis ligações com outras substâncias químicas (BORDIGNON *et al.*, 2009; WANG; ZHANG; WU, 2015).

Durante o armazenamento, a alteração desses parâmetros pode causar a oxidação ou outros tipos de reações químicas envolvendo as antocianinas, o que pode significar a modificação da sua síntese ou instabilidade desses compostos e resultar na substituição da cor vermelha característica do morango por pigmentos acastanhados, opacos ou na descoloração do fruto (WANG; ZHANG; WU, 2015).

O pH consiste em um fator importante na estabilidade da antocianina e na expressão da cor. Pequenas alterações do pH podem afetar as estruturas químicas das antocianinas, e produzir alguma degradação irreversível, causando desbotamento da cor (HOLCROFT; KADER, 1999).

Holcroft e Kader (1999) observaram a cor de morangos sofrendo um empalidecimento ou ‘branqueamento’ em decorrência do aumento do pH, em virtude da dissolução dos altos teores do gás CO₂ utilizado na atmosfera modificada criada.

Guerreiro *et al.* (2015) comentam sobre as concentrações de componentes nos revestimentos antimicrobianos, e os danos que as altas concentração de substâncias podem causar nas células da epiderme do morango, além das possíveis reações químicas que podem ocorrer entre os compostos da formulação. Em seus estudos, esses fatores resultaram na redução da firmeza e aumento da perda de peso do fruto.

Considerando o embasamento exposto, pode-se inferir que a mudança de coloração dos frutos no presente estudo foi causada pelo acréscimo no valor do pH após aplicação do OE-DU e ME-DU, que pode ser verificado na Tabela 25, e pela concentração do óleo incorporado na microemulsão. O aporte teórico justifica a influência do pH na expressão da cor pelas antocianinas, contudo, há necessidade de comprovar o efeito da concentração dos compostos na coloração do fruto. O que pode ser considerado como perspectiva futura a incorporação de um percentual inferior de óleo essencial no sistema microemulsionado e a observação da manutenção da cor.

Apesar da aplicação do OE-DU e da ME-DU ter originado uma coloração mais pálida nos morangos (Figura 36), não verificou-se a presença de fungos aparentes nos tempos de avaliação, ou seja, mesmo que a aplicação do OE-DU e da ME-DU tenha ocasionado a mudança da aparência do fruto, no entanto, não trouxe prejuízos para a vida de prateleira, pois os compostos presentes na composição do OE e incorporados na ME impediram a proliferação de fungos.

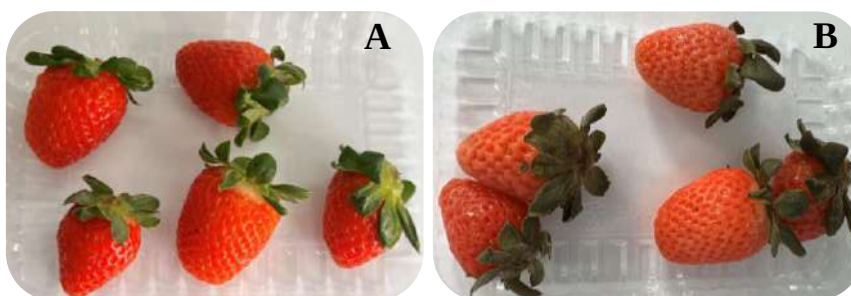
Os resultados comprovam que os bioprodutos (OE-DU e ME-DU) são mais eficazes que o sanitizante hipoclorito de sódio a 200 ppm para inibir o crescimento de fungos, pois os morangos sanitizados, após 3 dias, apresentaram áreas escuras decorrente do desenvolvimento de microrganismos, e com 10 dias ocorreu o crescimento de fungos (Figura 35).

Ressalta-se que as condições experimentais foram praticadas de forma idêntica para todos os grupos, visando assegurar uma avaliação igualitária a respeito da vida de prateleira dos morangos. Sendo assim, os morangos foram tratados conforme as diretrizes do fabricante (Peterfrut, Espírito Santo, Brasil), que recomenda refrigerá-los na temperatura de 2 a 5°C. O fabricante informa que os frutos devem ser lavados antes do consumo. Para o experimento, com exceção do grupo controle, dos morangos não sanitizados, os demais grupos de tratamento foram sanitizados, pois sabe-se que apenas a lavagem não é suficiente para retirar do alimento uma carga microbiana pré-existente, sendo necessário o procedimento da sanitização a fim de manter o alimento à níveis de contaminação considerados seguros (RODRIGUES *et al.*, 2011).

A aplicação da ME-DU resultou na presença de um líquido semelhante à ME na embalagem onde os morangos estavam contidos e acondicionados. Acredita-se que alguns dos morangos possam, eventualmente, ter tido uma quantidade maior de amostra, haja visto que a formulação é mais viscosa que o OE, por exemplo, e possa não ter drenado a porção necessária da amostra pelo filtro de nylon, o que resultou em um excesso da amostra nos frutos.

Com o intuito de verificar os resultados de outro protocolo para originar um revestimento fino na superfície de frutos, sem que haja excesso da amostra, e verificar também se afeta a coloração dos frutos, testou-se a aplicação por *spray*, onde utilizou-se um recipiente de 100mL (Manancial do Brasil Importação e Comércio Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) com válvula que pulverizou uniformemente as amostras nos frutos. Com 3 dias após a aplicação por *spray*, observou-se que a cor dos morangos tornou-se menos intensa, como ocorreu na aplicação por imersão (Figura 37).

Figura 37 - Grupo de morangos no dia do procedimento (A) e com 3 dias (B) após aplicação por *spray* do óleo essencial de *Duguetia stelechantha*.



Fonte: Autora (2024).

Os morangos da pulverização da ME-DU, apresentaram com 7 dias uma pequena quantidade de líquido ao redor dos frutos, entretanto, este líquido de cor avermelhada, diferenciava-se do líquido observado na aplicação por imersão, que era semelhante à ME. Dessa

forma, para testes com formulações mais viscosas, sugere-se a aplicação por *spray*, para assim evitar excesso de amostras no estudo.

A qualidade dos morangos em relação à bactérias e a vida de prateleira foi investigada pela Contagem Total de Aeróbios Mesófilos em placas, onde resultou-se que os morangos que não foram sanitizados apresentaram a maior carga microbiana em todos os tempos de avaliação, apresentando uma elevação significativa dos microrganismos, de $2,2 \times 10^3$ a $1,0 \times 10^4$ UFC/g, no tempo de 7 a 15 dias (Tabela 28; Figura 38). Os morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm também destacaram-se por conter quantidade de bactérias superior aos demais grupos verificados, apresentando no tempo 0 o quantitativo de $3,4 \times 10^2$ UFC/g e com 15 dias o equivalente a $8,6 \times 10^3$ UFC/g. Esse resultado mostra que a sanitização com hipoclorito de sódio não foi suficiente para eliminar a contaminação presente nos frutos. Sendo necessário a implementação de um produto antimicrobiano alternativo, como é o caso dos produtos naturais propostos aqui.

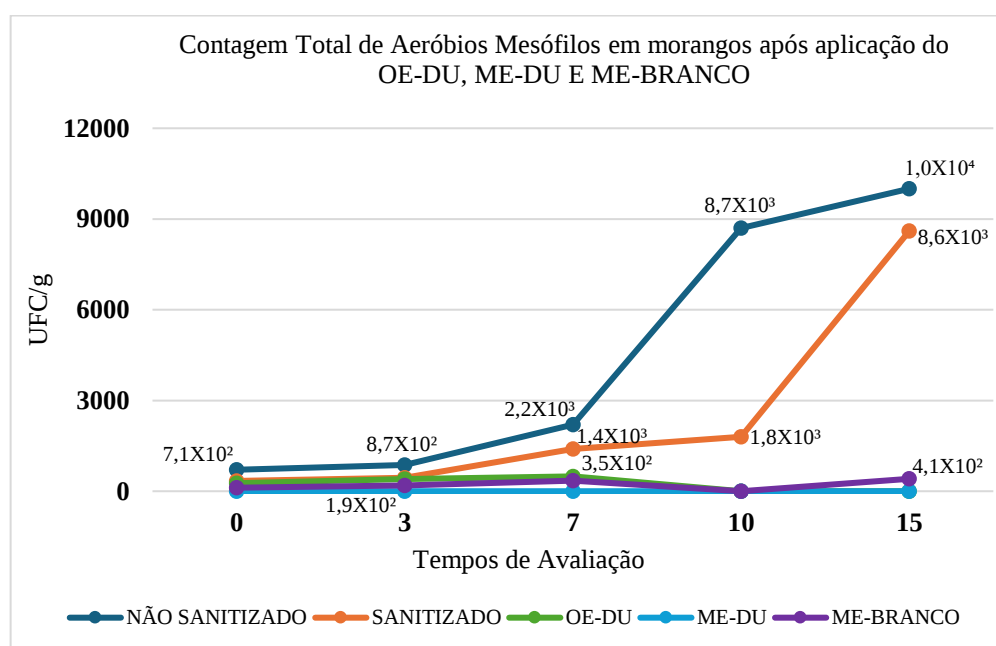
Nos morangos da aplicação do OE-DU contou-se uma certa quantidade de aeróbios no tempo inicial, ($2,6 \times 10^2$ UFC/g), com 3 dias ($4,0 \times 10^2$ UFC/g), e após 7 dias da imersão na amostra contou-se $4,9 \times 10^2$ UFC/g. Mesmo apresentando um certo número de bactérias nos tempos iniciais, depois de 15 dias de armazenamento, os morangos da aplicação do OE-DU tiveram menor contagem de bactérias mesófilas aeróbicas em comparação com os morangos não sanitizados e os sanitizados. E chama-se atenção, que a quantidade contada no 7º dia foi reduzida a zero nos dias seguintes, o que pode ser explicado pelo conceito de tempo-dependente, em que diz que a ação é otimizada com o passar do tempo (SPINOSA *et al.*, 2017). A microemulsão (ME-DU) foi capaz de inibir o desenvolvimento de bactérias nos frutos testados, não evidenciando nenhuma colônia de aeróbios mesófilos nas placas analisadas em todos os tempos do experimento. O que comprova que a microemulsão otimizou a atividade antimicrobiana do OE. Os morangos da aplicação do ME-BRANCO indicaram bactérias na maioria dos tempos, confirmando que a atividade é desenvolvida pelos princípios ativos do OE e não pelos tensoativos inseridos na formulação. Os morangos desse último grupo apresentaram no primeiro tempo de análise $1,2 \times 10^2$ UFC/g, essa quantidade obteve uma elevação após 3 e 7 dias, $1,9 \times 10^2$ UFC/g; $3,5 \times 10^2$ UFC/g, respectivamente, com 10 dias não houve crescimento de colônias e no último tempo de análise observou-se $4,1 \times 10^2$ UFC/g (Tabela 28; Figura 38). Não houve crescimento de aeróbios mesófilos no controle do meio.

Tabela 28 - Contagem Total de Aeróbios Mesófilos em placas com morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos submetidos à aplicação do OE-DU, ME-DU e ME-BRANCO, em todos os tempos de avaliação.

TEMPO Dias	NÃO SANITIZADO	SANITIZADO	OE-DU UFC/g	ME-DU	ME-BRANCO
0	$7,1 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$	0	$1,2 \times 10^2$
3	$8,7 \times 10^2$	$4,4 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$	0	$1,9 \times 10^2$
7	$2,2 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	$4,9 \times 10^2$	0	$3,5 \times 10^2$
10	$8,7 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$	0	0	0
15	$1,0 \times 10^4$	$8,6 \times 10^3$	0	0	$4,1 \times 10^2$

Fonte: Autora (2024).

Figura 38 - Gráfico da Contagem Total de Aeróbios Mesófilos em placas com morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos submetidos à aplicação do OE-DU, ME-DU e ME-BRANCO, em todos os tempos de avaliação.



Fonte: Autora (2024).

Comparando-se os resultados obtidos com os de demais pesquisadores, encontramos que Khan *et al.* (2019) também verificaram que o crescimento de aeróbios mesófilos aumentou ao longo do período de armazenamento, com destaque para o grupo controle, que foi de aproximadamente $2,4 \times 10^2$ a $2,1 \times 10^5$ UFC/g (2,43 e 5,3 log UFC/g), sendo estes valores superiores aos identificados no presente estudo. Já com o revestimento antimicrobiano proposto por Khan *et al.* (2019), o quantitativo foi inferior ao do grupo controle, mas ainda surgiram de $1,1 \times 10^2$ a $2,2 \times 10^3$ UFC/g de aeróbios mesófilos nos morangos. Horison *et al.* (2019) também verificaram que morangos, armazenados a 10°C por 5 dias, e imersos em nanoemulsão de óleo de semente de noz-moscada, com quitosana e Tween 80 apresentaram um número inferior de bactérias mesófilas $2,7 \times 10^2$ UFC/g ($2,41 \pm 0,01$ log UFC/g) em comparação aos frutos do grupo controle $2,4 \times 10^3$ UFC/g ($3,37 \pm 0,02$ log UFC/g). Guerreiro *et al.* (2015) em uma investigação de 14 dias, concluíram que no grupo controle de morangos surgiram de $8,4 \times 10^2$ a $4,2 \times 10^5$

UFC/g (2,9 a 5,6 log 10 UFC/g) colônias de mesófilos aeróbicos. E no grupo de morangos revestidos com a formulação de Alginato de sódio 2% + Citral 0,15% + Eugenol 0,10%, a contagem dos microrganismos reduziu de $8,4 \times 10^2$ UFC/g (2,9 log 10 UFC/g a zero) a zero colônias de aeróbios mesófilos.

Enquanto no presente estudo, surgiram no grupo de morangos da aplicação do OE-DU apenas $2,6 \times 10^2$ a $4,9 \times 10^2$ UFC/g, e no grupo da ME-DU não houve crescimento de microrganismos em nenhum dos tempos de avaliação, considera-se portanto, que os nossos resultados da formulação estão mais promissores que os disponíveis na literatura.

Horison *et al.* (2019) comentam que o encapsulamento de óleo essencial em nanoescala pode otimizar a ação antimicrobiana, pois há uma maior concentração dos princípios bioativos na região onde os microrganismos estão presentes (HORISON *et al.*, 2019).

No presente estudo, a situação observada no tempo 10 após aplicação do ME-BRANCO, que houve uma redução significativa do crescimento de microrganismos e no tempo seguinte, de 15 dias, voltou o crescimento a ascender, também foi observado por Guerreiro *et al.* (2015), nos tempos de 7 e 14 dias do experimento com morangos revestidos com formulações a base de Alginato de sódio e de Pectina.

Os morangos foram pesquisados ainda sobre a infecção fúngica. Utilizou-se a técnica de enumeração de bolores e leveduras e o método de plaqueamento em profundidade (Tabela 29; Figuras 39 e 40). A maior proliferação fúngica foi visualizada nos morangos que não foram sanitizados. Em todos os tempos de avaliação, com exceção do tempo zero, notou-se neste grupo controle o maior número de colônias de fungos, elevando-se de $2,7 \times 10^2$ UFC/g no tempo 0 a $6,9 \times 10^3$ UFC/g no 15º dia. No grupo dos morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio foi possível identificar inicialmente $1,5 \times 10^2$ UFC/g, após houve uma redução do número de colônias a zero no 3º dia de análise, com 7 dias alcançou-se $1,6 \times 10^3$ UFC/g, valor este que chegou a $7,3 \times 10^2$ UFC/g no último tempo de análise. Os morangos submetidos à aplicação do OE-DU apresentaram infecção fúngica ($3,9 \times 10^2$ UFC/g) apenas no tempo 0, nos demais tempos, o OE foi capaz de inibir o crescimento e desenvolvimento dos fungos. Já os morangos da aplicação da ME-DU não apresentaram fungos no tempo inicial, com 3 dias houve o surgimento de fungos, e a quantidade ($4,0 \times 10^2$ UFC/g) foi mantida no tempo seguinte. No tempo de 10 dias, alcançou $6,5 \times 10^2$ UFC/g e com 15 dias os morangos não apresentaram fungos. Mesmo apresentando um certo de número de bactérias nos tempos iniciais, depois de 15 dias de armazenamento, os morangos da aplicação do ME-DU tiveram menor contagem de bactérias mesófilas aeróbicas em comparação com os morangos não sanitizados e os sanitizados. O grupo que recebeu o ME-BRANCO proliferou fungos na maioria dos tempos.

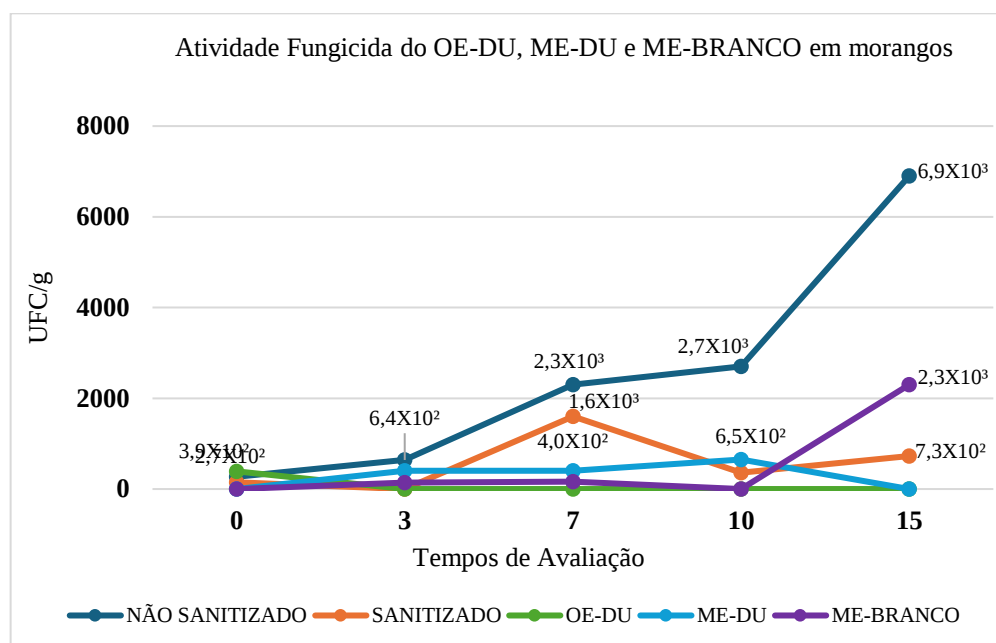
Com 3 dias ($1,4 \times 10^2$ UFC/g), 7 dias ($1,6 \times 10^2$ UFC/g) e com 15 dias ($2,3 \times 10^3$ UFC/g) (Tabela 29; Figura 39). Não houve crescimento de fungos no controle do meio.

Tabela 29 - Proliferação de fungos em morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos submetidos à aplicação do OE-DU, ME-DU e ME-BRANCO, em todos os tempos de avaliação.

TEMPO Dias	NÃO SANITIZADO	SANITIZADO	OE-DU	ME-DU	ME-BRANCO
	UFC/g				
0	$2,7 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$3,9 \times 10^2$	0	0
3	$6,4 \times 10^2$	0	0	$4,0 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$
7	$2,3 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	0	$4,0 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$
10	$2,7 \times 10^3$	$3,6 \times 10^2$	0	$6,5 \times 10^2$	0
15	$6,9 \times 10^3$	$7,3 \times 10^2$	0	0	$2,3 \times 10^3$

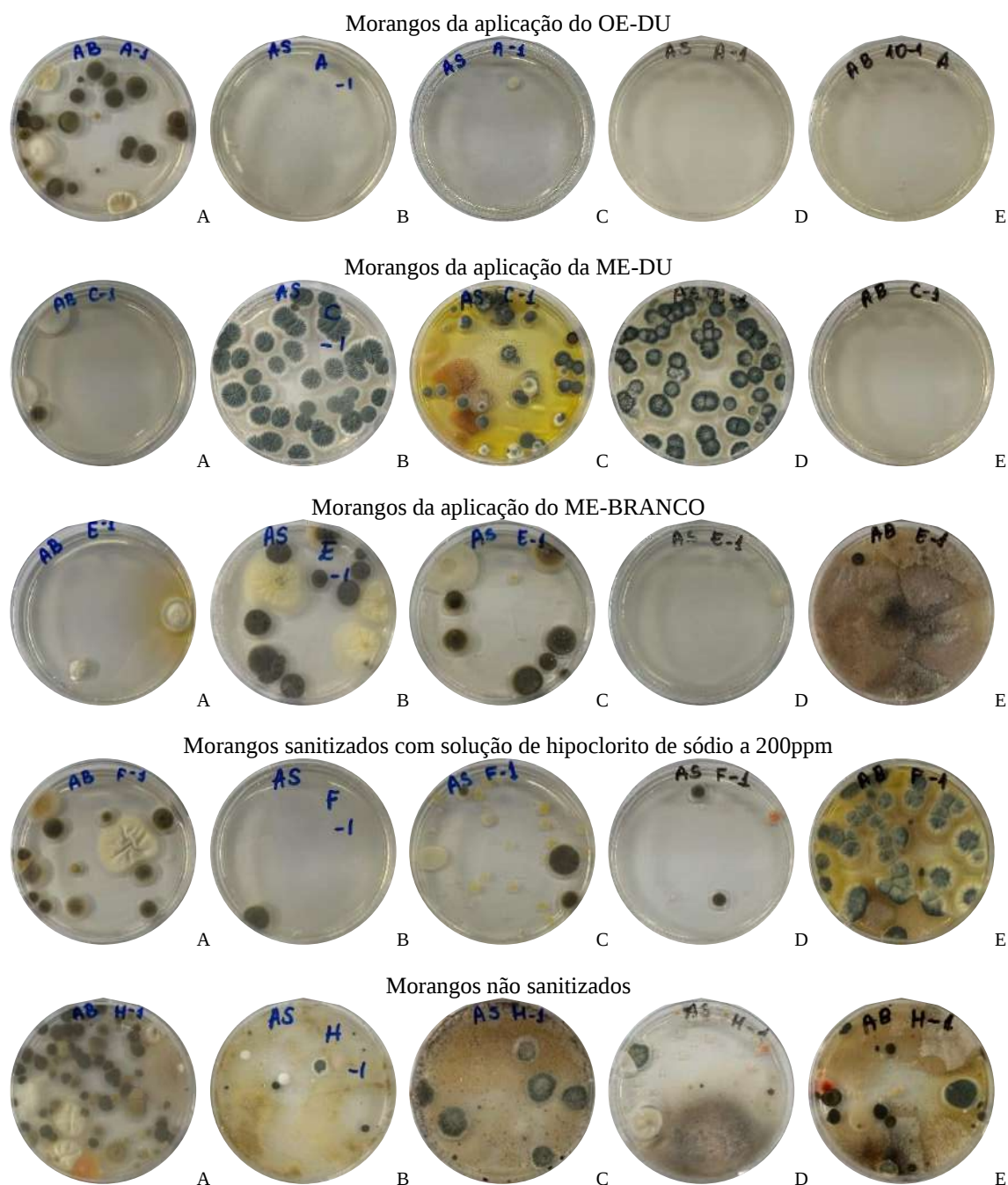
Fonte: Autora (2024).

Figura 39 - Gráfico da proliferação de fungos em morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos submetidos à aplicação do OE-DU, ME-DU e ME-BRANCO, em todos os tempos de avaliação.



Fonte: Autora (2024).

Figura 40 - Avaliação da proliferação de fungos provenientes dos morangos da aplicação do OE-DU, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm e morangos não sanitizados, no tempo zero (A), com 3 (B), 7 (C), 10 (D) e 15 (E) dias após o procedimento.



Fonte: Autora (2024).

Analizando os resultados obtidos, e comparando com os disponíveis na literatura, verificamos que em outras investigações, a contagem de bolores e leveduras também aumentou para o grupo controle com o tempo de armazenamento, elevando-se de $2,1 \times 10^2$ a $3,3 \times 10^6$ UFC/g (2,34 e 6,49 log UFC/g) (KHAN *et al.*, 2019). Os pesquisadores registraram inicialmente valores menores do que os anotados por nós, mas no final do teste alcançaram valores superiores

ao encontrado no presente estudo, pois obtivemos no último tempo de avaliação o equivalente a $6,9 \times 10^3$ UFC/g. E em morangos com revestimento antimicrobiano, Khan *et al.* (2019) enumeraram de $1,6 \times 10^2$ a $1,1 \times 10^5$ UFC/g (2,22 e 5,04 log UFC/g). Os pesquisadores contaram um número mais elevado de bolores e leveduras nos morangos revestidos do que o verificado por nós nos morangos da aplicação do OE-DU e ME-DU, que atingiram no máximo $6,5 \times 10^2$ UFC/g, no 10º dia do experimento.

Já Horison *et al.* (2019) encontraram nos morangos revestidos fungos da ordem de $6,3 \times 10^2$ UFC/g (2,78 log UFC/g). Apesar deste ser um valor inferior ao encontrado por nós, vale ressaltar que as condições do experimento foram diferentes, os frutos pesquisados por Horison *et al.* (2019) foram armazenados a 10°C e por 5 dias. Sendo esta uma temperatura mais elevada do que a utilizada no presente estudo e o tempo foi um terço do que analisamos. E o grupo controle de morangos apresentaram $2,5 \times 10^3$ UFC/g ($3,69 \pm 0,14$ log UFC/g) colônias de bolores e leveduras, sendo este um valor intermediário encontrado entre o 7º e 10º de avaliação no presente estudo.

Guerreiro *et al.* (2015) também perceberam que a contagem de bolores e leveduras aumentou ao longo dos 14 dias de armazenamento em todos os tratamentos. No controle foram identificadas de $3,0 \times 10^2$ a $1,0 \times 10^4$ UFC/g (2,5 a 4,0 log 10 UFC/g) colônias de fungos. E nos morangos revestidos com a formulação de Pectina 2% + Citral 0,15% + Eugenol 0,10% houve uma redução nos fungos, de $3,0 \times 10^2$ a $2,1 \times 10^1$ UFC/g (2,5 a 1,3 log 10 UFC/g). Guerreiro *et al.* (2015) ainda observaram em um dos seus revestimentos, a mesma situação ocorrida no tempo 10 após aplicação do ME-BRANCO do presente estudo, que houve uma redução significativa do crescimento de microrganismos e no tempo seguinte, de 15 dias, voltou o crescimento a ascender.

De acordo com os resultados, no tempo zero do experimento, ou seja, 01h após a aplicação das amostras, houve a presença de aeróbios mesófilos em todos os grupos de tratamento, com exceção do grupo da imersão na ME-DU. Tal constatação evidencia que a formulação foi eficiente em eliminar os microrganismos em um tempo curto, de 01 hora, que foi o período considerado como tempo zero. Khan *et al.* (2019) também observaram que assim que aplicaram o revestimento antimicrobiano do seu estudo, o nível de aeróbios mesófilos e de bolores e leveduras foi reduzido. E em relação aos fungos, no presente estudo, no tempo inicial também foi isento de fungos apenas no grupo do ME-DU e do ME-BRANCO. No entanto, no tempo seguindo (de 3 dias), os fungos desenvolveram-se.

Silva *et al.* (2015) inferem que o mecanismo de ação de microemulsões em fungos é semelhante ao mecanismo realizado em bactérias, em que ocorre a disfunção da membrana

plasmática, alterações na parede celular e no metabolismo intracelular, coagulação do citoplasma e por fim a morte celular. No entanto, a atividade antimicrobiana em relação aos fungos é inferior à das bactérias (SILVA *et al.*, 2015), como foi observado no presente estudo com a ME-DU.

Zhang *et al.* (2010) comentam sobre essa atividade biocida menor em fungos, que em bactérias, que microemulsões apresentam. Zhang *et al.* (2010) apresentaram resultados de outros pesquisadores, que observaram que microemulsões causaram perda de viabilidade em bactérias em apenas 45 segundos, enquanto em fungos, a perda completa de viabilidade foi obtida em 5 minutos.

Em frutas frescas, como o morango, pode-se encontrar microrganismos, como bolores e leveduras, e bactérias mesófilas. Colônias de 10^3 a 10^9 UFC/g desses microrganismos podem se originar no campo, no momento da colheita, ou no transporte, na comercialização ou até durante a manipulação pelo consumidor. Quando a proliferação desses microrganismos ocorre ainda no campo, eles podem contaminar outros frutos e causar a deterioração substancial apenas no pós-colheita, que é quando as defesas da planta minimizam-se. Dessa forma, há a possibilidade de frutos *in natura* chegarem até o consumidor já com a presença de uma carga microbiana, que deveria ser eliminada com o procedimento da sanitização (ALVES *et al.*, 2019; TOURNAS; KATSODAS, 2005).

Notou-se que a quantidade de fungos presentes no tempo inicial do experimento foi eliminada pela sanitização. Além disso, o sanitizante evitou nova proliferação com 3 dias. No entanto, com 7 dias, o hipoclorito de sódio não conseguiu conter o desenvolvimento do microrganismo. De acordo com Rodrigues *et al.* (2011), o sanitizante consegue reduzir apenas até dois ciclos logarítmicos da carga de microrganismos. Essa redução da microbiota competitiva pode possibilitar o desenvolvimento de patógenos.

No presente estudo, foram identificados nos morangos os gêneros de fungos: *Curvularia*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Purpureocillium* e *Talaromyces* (Figura 41). A identificação dos fungos ocorreu após 7 dias de crescimento, onde foram observadas as características macroscópicas (Tabela 30): diâmetro, textura, pigmentação, superfície, borda, topografia, cor, aspecto, pigmento e crescimento; e as características microscópicas das estruturas morfológicas (Tabela 31): hifa, conídio, conidióforo, fialide, célula pé e vesícula. A identificação dos fungos filamentosos a nível do gênero, seguiu as recomendações do livro “*Larone’s medically important fungi: a guide to identification*” (LARONE *et al.*, 2018).

Dos fungos detectados, alguns são definidos na literatura como os mais comuns encontrados em morangos, como é o caso dos fungos dos gêneros *Penicillium* e *Cladosporium*.

Esses fungos originam doenças no fruto, associadas a fermentos pós-colheita (TOURNAS; KATSOUDAS, 2005). Souza (2017) cita as espécies *Penicillium expansum*, *Penicillium purpurogenum* e *Aspergillus niger* como as principais fitopatogênicas causadoras de deterioração avançada nos morangos. Os fungos pertencentes ao gênero *Talaromyces* merecem um certo destaque, pois são capazes de produzir esporos termorresistentes, e por esta razão conseguem sobreviver aos tratamentos térmicos do processamento de alimentos (MÜLLER; SILVA, 2019).

Tournas, Heeres e Burgess (2006) também identificaram a presença de *Cladosporium* em saladas de morango. Tournas e Katsoudas (2005) verificaram que espécies fúngicas de *Cladosporium* criaram manchas escuras e fungos de *Penicillium* produziram uma podridão mole em morangos, que foram cobertos com conídios verdes ou azulados e com odor forte e desagradável. Souza (2017) identificou a espécie fúngica *Purpureocillium lilacinus* em sistemas de cultivo de morangueiro. O fungo foi obtido a partir de *Lobiopa insularis*, uma das principais pragas da cultura de morangueiros. Da mesma forma, foram identificados os fungos do gênero *Talaromyces* (*T. amestolkiae* e *T. verruculosus*), *Aspergillus* (*Aspergillus nomius* e *Aspergillus westerdijkiae*), e *Penicillium* (*Penicillium brasilianum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium commune*, *Penicillium janthinellum* e *Penicillium paxilli*). Esses gêneros também foram registrados no presente trabalho.

A literatura não menciona o gênero *Curvularia* encontrado em morangos. Muitas das espécies desse gênero de fungo são patogênicas, sendo responsáveis por uma variedade de doenças em plantas, originam frequentemente manchas foliares e causam perdas na produção agrícola (SANTOS *et al.*, 2018).

Da planta de onde foi extraído o OE-DU, *Duguetia stelechantha*, foram isolados fungos do gênero *Penicillium* e *Talaromyces*. Os fungos encontrados como endofíticos, conseguiram produzir metabólitos secundários com atividades antibacteriana, antifúngica, entre outras (GUIMARÃES *et al.*, 2019; KOOLEN *et al.*, 2013). Souza (2012) verificou que das linhagens de microrganismos endofíticos isolados de *D. stelechantha*, vários apresentaram atividade inibitória contra os fungos *Penicillium avellani* e *Candida albicans*, e ainda contra a bactéria gram-positiva *Bacillus cereus*.

Tabela 30 - Características macroscópicas dos fungos com 7 dias de crescimento em meio SDA (Ágar *Sabouraud* dextrose) a 25±3°C, isolados de morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos após aplicação do óleo essencial (OE-DU), microemulsão (ME-DU) de *Duquetia stelechantha* e branco da microemulsão (ME-BRANCO).

Fungo	Diâmetro (mm)	Textura	Pigmentação	Superfície	Borda	Topografia	Cor	Aspecto	Pigmento	Crescimento
1	7,50	Aveludada	Inalterada	Lisa e cinza	Regulares	Plana	Verde musgo escuro	Seco	Ausência	Rápido
2	1,00	Camurça	Inalterada	Fissurada	Irregulares e brancas	Pregueada, centro umbilicado	Verde	Opaco	Ausência	Lento
3	4,50	Pulverulenta	Inalterada	Lisa	Irregulares	Plana	Preta	Úmido	Ausência	Rápido
4	6,50	Coriáceas	Inalterada	Rugosa	Regulares	Plana	Amarela, centro marrom	Brilhante	Ausência	Rápido
5	3,00	Aveludada	Inalterada	Fissurada	Regulares e brancas	Plana, centro pregueado	Verde	Opaco	Ausência	Rápido
6	4,50	Camurça	Inalterada	Fissurada	Irregulares e amarelas	Pregueada, centro umbilicado	Branca	Opaco	Presença, amarelo	Rápido
7	2,30	Algodonosa	Inalterada	Lisa	Irregulares	Umbilicada	Branca, centro roxo	Opaco	Ausência	Rápido
8	2,00	Camurça com borda coriácea	Alterada	Lisa	Irregulares e brancas	Umbilicada	Verde, centro vermelho	Opaco	Presença, vermelho	Rápido
9	5,30	Pulverulenta	Inalterada	Rugosa	Regulares	Umbilicada	Preta, centro branco	Opaco	Ausência	Lento
10	3,00	Camurça	Inalterada	Fissurada	Irregulares	Pregueada, centro umbilicado	Branca	Opaco	Ausência	Lento

Fonte: Autora (2024).

Tabela 31 - Características microscópicas dos fungos isolado de morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos após aplicação do óleo essencial (OE-DU), microemulsão (ME-DU) de *Dugetia stelechantha* e branco da microemulsão (ME-BRANCO).

Fungo	Hifa	Conídio	Conidióforo	Fialide	Célula pé	Vesícula
1	Septada e escuras	Septado, escuro	Curto, septado e escuro	Ausente	Presente	Ausente
2	Septada, escura	Bastão, circulares, escuro			Presente	
3	Ausente	Redondo, liso, escuro	Longo, escuro	+ 7	Ausente	Irradiada
4	Septada, hialina	Redondo, hialino	Curto, septado	+ 7	Presente	Achatada
5	Septada, hialina	Redondo, liso, hialino	Curto, septado, hialino	3 a 5	Presente	Ausente
6	Septada, hialina	Redondo, hialino, liso	Curto/Longo, septado, hialino	3 a 4	Presente	
7	Septada, hialina	Circulares, liso, hialino	Longo	3 a 5	Presente	Ausente
8	Lisa, hialina, septada	Liso, esférico, hialino	curto, liso, hialino	3 a 5	Presente	Ausente
9	Ausente	Redondo, escuro	Longo, escuro	Ausente	Ausente	Irradiada
10	Septada, hialina	Redondo, liso, hialino	Curto, septado	3 a 4	Presente	Ausente

Fonte: Autora (2024).

Nota: ND: Não determinado.

Figura 41 - Características macroscópicas (verso e anverso) das colônias com 7 dias de crescimento em meio SDA (Ágar *Sabouraud* dextrose) acidificado, a $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotografia de microscopia óptica 40x com características microscópicas dos gêneros de fungos filamentosos identificados.

Fungo 1 - *Curvularia*



Fungo 2 - *Cladosporium*

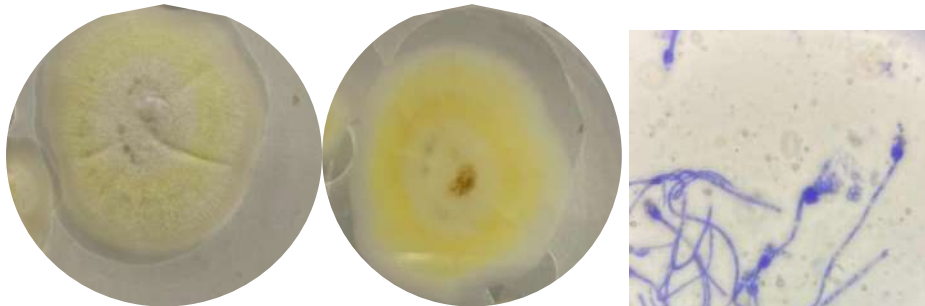
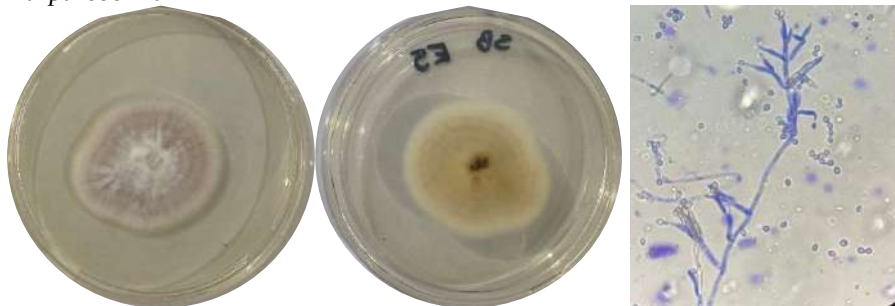
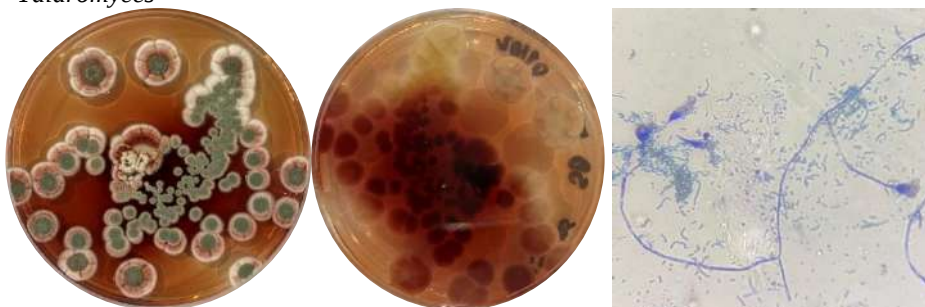
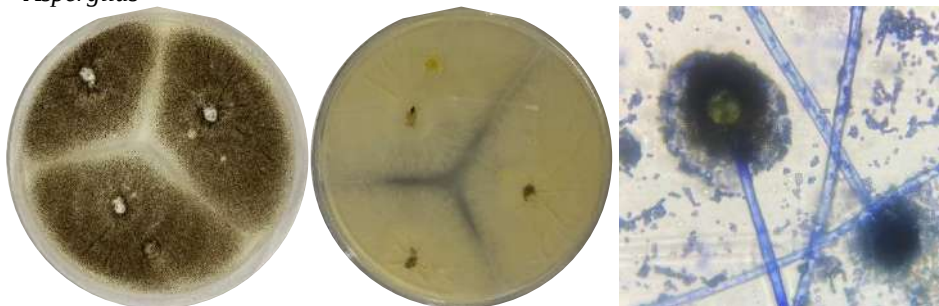


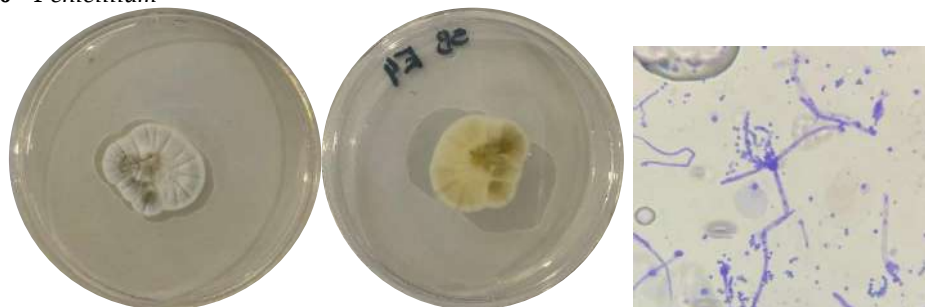
Fungo 3 - *Aspergillus*



Fungo 4 - *Aspergillus*



Fungo 5 – *Penicillium***Fungo 6- *Penicillium*****Fungo 7 – *Purpureocillium*****Fungo 8 - *Talaromyces*****Fungo 9 - *Aspergillus***

Fungo 10 - *Penicillium*

Fonte: Autora (2024).

Alguns dos fungos citados podem produzir micotoxinas causando riscos à saúde, como o desenvolvimento de alergias (TOURNAS; KATSODAS, 2005). Há relatos na literatura de que espécies de fungos de *Penicillium* e *Aspergillus* podem crescer e produzir micotoxinas em temperatura ambiente e até em baixas temperaturas (TOURNAS; KATSODAS, 2005). Assim, infere-se que o controle antifúngico em morangos deve ser rigoroso, sendo necessário a busca e implementação de medidas alternativas, como o uso de produtos naturais, que apresentam em suas composições vários constituintes que têm atividades antimicrobianas e antifúngicas comprovadas, como o δ -cadineno, β -pineno, Limoneno, p-Cimeno, óxido de cariofileno, entre outros, presentes em espécies de Duguetias (SOUSA *et al.*, 2012).

A ação antifúngica realizada pelo OE-DU e a ação antimicrobiana demonstrada pela ME-DU podem ser atribuídas a esses componentes. Entretanto, o mesmo potencial antifúngico do OE-DU não foi executado pela ME-DU, possivelmente porque em sua composição não ocorreu, entre os diferentes compostos resultantes da incorporação do OE na formulação, a ação sinérgica necessária para desempenhar tal atividade biológica. Da mesma forma que a mesma eficiência da atividade antimicrobiana realizada pela ME-DU não foi visualizada no OE-DU.

Com base nos resultados discutidos, a aplicação do OE-DU e da ME-DU tem potencial para ampliar a vida útil dos morangos durante o armazenamento, inibindo a proliferação de bactérias e fungos. Estudos adicionais são necessários para otimizar a aplicação do produto natural a fim de utilizá-lo como material de revestimento na indústria alimentícia.

4.9.2 Aplicação do óleo essencial e da microemulsão de *Pectis brevipedunculata* em morangos

O pH, teor de sólidos solúveis em °BRIX e a umidade dos morangos foram verificados no tempo 0 e com 15 dias após a aplicação das amostras (Tabela 32). Inicialmente, o morango não sanitizado apresentou pH 3,24, caracterizando-se como ácido. O fruto que não recebeu a sanitização com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm manteve o potencial hidrogeniônico pelos 15 dias de avaliação. Os morangos sanitizados e os imersos no óleo essencial e na microemulsão de *Pectis brevipedunculata* apresentaram, após 15 dias, valores de pH superiores, em relação ao grupo controle não sanitizado, mas mantiveram-se na faixa de pH ácido. O pH da polpa de morango, sendo esta considerada como a parte comestível do fruto, deve ser igual a 3,3, segundo a Instrução Normativa nº 37 de 01/10/2018 do MAPA (BRASIL, 2018), e o pH da porção comestível do morango no seu estado normal e natural pode ainda se encontrar na faixa entre 3,0 e 3,90, de acordo com a *Food and Drugs Administration* (FDA) (FDA/CFSAN, 2008). Portanto, a aplicação do OE-DU e ME-DU nos morangos não modificou o pH esperado para o fruto.

O aumento do pH em morangos revestidos também foi verificado por Duran *et al.* (2016). No estudo com revestimento de quitosana, natamicina, nisina, romã e extrato de semente de uva, os pesquisadores encontraram pH de 3,33 a 3,56 nos morangos não revestidos e pH de 3,33 a 3,49 nos morangos com revestimento. Eles justificam a elevação do pH devido à utilização de ácidos orgânicos durante a respiração no período de armazenamento.

Tabela 32 - pH, teor de sólidos solúveis totais e umidade dos morangos antes e após aplicação do óleo essencial e da microemulsão de *Pectis brevipedunculata*.

TEMPO	AMOSTRAS	pH	°BRIX	UMIDADE
0 dia	MORANGO NÃO SANITIZADO	3,24 ± 0,01	5,30 ± 0	90,85% ± 0,02
	MORANGO NÃO SANITIZADO	3,24 ± 0,03	5,00 ± 0,01	89,18% ± 0,03
	MORANGO SANITIZADO	3,47 ± 0,01	5,00 ± 0,01	89,49% ± 0,03
15 dias	OE-PB	3,58 ± 0,02	6,30 ± 0,02	88,56% ± 0,01
	ME-PB	3,56 ± 0,02	10,20 ± 0,02	90,60% ± 0,01
	ME-BRANCO	3,71 ± 0,01	10,20 ± 0,01	88,85% ± 0,02

Fonte: Autora (2024).

Em relação ao teor de sólidos solúveis, os morangos não sanitizado analisados no tempo 0 apresentaram 5,30°Brix, e no tempo de 15 dias, apresentaram 5,00°Brix. No

último tempo de observação, o morango sanitizado também apresentou 5,00°BRIX e os grupos de morangos que foram imersos no OE-PB, ME-PB e ME-BRANCO apresentaram valores mais elevados de sólidos solúveis totais, de 6,3; 9,0 e 10,2°BRIX, respectivamente (Tabela 32). O teor de sólidos solúveis esperado para a polpa do morango, de acordo com a IN n°37 do MAPA (BRASIL, 2018), é de 6,50°BRIX. Sendo assim, dos valores obtidos, os mais distantes desse valor de referência foram os da aplicação do ME-PB e do ME-BRANCO.

No estudo de Duran *et al.* (2016) também foi possível notar que o grupo controle apresentou uma redução no teor de sólidos totais durante o armazenamento, de 10,86° para 8,22°BRIX. A redução desse parâmetro foi maior no grupo controle do que nos demais grupos com revestimentos. Embasado em Aday e Caner (2013), Duran *et al.* (2016) explicam que nos frutos não revestidos a hidrólise da sacarose, que ocorre a fim de manter a atividade fisiológica, desenvolveu-se com uma velocidade maior, do que nos grupos dos morangos revestidos, e por consequência tem-se a diminuição dos sólidos solúveis. Duran *et al.* (2016) ainda verificaram que durante os 5 primeiros dias de armazenamento os morangos revestidos com quitosana e extrato de romã apresentaram aumento do teor de sólidos solúveis, de 10,86° para 10,94°BRIX, como nos frutos da aplicação do OE-DU, ME-DU e ME-BRANCO do presente trabalho.

Antes do início do procedimento (tempo 0) o morango apresentou teor de umidade de 90,85%. Este teor de umidade é próximo ao citado na Tabela Brasileira da Composição dos Alimentos (TACO, 2011), que é de 91,50%. Após 15 dias, a umidade reduziu-se em todos os grupos de tratamentos, com exceção do grupo que foi aplicado a ME-PB, que apresentou umidade próxima ao do tempo inicial do experimento, de 90,60%. Dos demais grupos, os que apresentaram menor teor de umidade, foi o da aplicação do OE-PB e ME-BRANCO, com 88,56% e 88,85%, respectivamente (Tabela 32).

A redução do peso dos morangos no período de 15 dias foi crescente, com exceção dos tempos 10 e 7 dias, para os morangos com aplicação do OE-PB e ME-PB, respectivamente. Dos grupos avaliados, os morangos não sanitizados e os morangos com a aplicação do ME-BRANCO perderam mais peso que os frutos da aplicação do OE-PB e ME-PB, elevando-se a taxa de perda de peso de 0,14 para 4,32% e de 0,47 para 4,89%, respectivamente (Tabela 32). Os revestimentos em frutos exercem o papel de uma camada extra, que reveste os estômatos, causando uma redução na transpiração e, por consequência uma redução na perda de peso (GUERREIRO *et al.*, 2015), o que foi notado

quando compara-se o grupo da aplicação do ME-PB com o grupo dos morangos não sanitizados.

Em estudo com morangos com revestimentos comestíveis a base de quitosana, Khan *et al.* (2019) observaram que com o prolongamento do tempo de armazenamento, houve também o aumento da perda de peso de todos os grupos de tratamentos dos morangos. O grupo controle perdeu 2,02% de peso, enquanto o grupo de morangos revestidos perdeu 1,37% de peso ao final do armazenamento de 8 dias. Guerreiro *et al.* (2015) estudando revestimentos comestíveis à base de polissacarídeos, alginato de sódio e pectina, enriquecidos com constituintes de óleos essenciais, citral e eugenol, verificaram que a perda de peso de morangos aumentou em todas os tratamentos durante o armazenamento de 14 dias a 0,5°C. O controle perdeu 4,60% com 14 dias de armazenamento. Nos revestimentos com as variadas formulações com os polissacarídeos, incluindo proporções diferentes de citral e eugenol, foi possível observar perda de peso de 4,00% até 9,90%.

Tabela 33 - Perda de peso dos morangos após aplicação do óleo essencial e da microemulsão *Pectis brevipedunculata*.

TEMPO	MORANGO NÃO SANITIZADO	AMOSTRAS			
		MORANGO SANITIZADO	OE-PB	ME-PB	ME-BRANCO
3 DIAS	0,14%	0,13%	0,36%	1,45%	0,47%
7 DIAS	2,05%	0,34%	1,37%	1,19%	1,17%
10 DIAS	2,08%	0,86%	1,09%	1,91%	1,84%
15 DIAS	4,32%	0,97%	1,51%	2,05%	4,89%

Fonte: Autora (2024).

A decadência visual dos morangos foi analisada, sendo classificados como deteriorados aqueles que apresentaram lesão visível, de cor escura, o que representa área infectada por microrganismos, como definido por Khan *et al.* (2019), além desse aspecto, analisou-se a modificação da textura, com a perda de firmeza do fruto e a presença de infecção fúngica. Notou-se que com 3 dias de análise, o grupo de morangos que não foram sanitizados começou a apresentar injúrias na estrutura do fruto, destacando-se a mudança para coloração escura e a alteração da textura nessas regiões. A taxa de apodrecimento nesse primeiro grupo nesse tempo de análise foi de 50,00%. O grupo de morangos que foram sanitizados com hipoclorito de sódio a 200ppm apresentou as mesmas características do grupo citado anteriormente, no entanto, a deterioração foi menor, 16,67%. Com 7 dias, as alterações foram intensificando-se, 75,0% dos morangos

não sanitizados e 50,00% dos sanitizados já foram considerados deteriorados. Com 10 dias surgiu nesses grupos a proliferação visível de fungos, onde obteve-se 100,00% de apodrecimento dos morangos que não foram sanitizados, e 66,67% dos morangos que receberam o sanitizante. E no último dia de análise, este último grupo, obteve 83,33% de taxa de apodrecimento (Tabela 33, Figura 42).

Estudo avaliando infecção fúngica visível em morangos detectou a proliferação dos microrganismos após 4 dias de armazenamento na temperatura de 10°C (KHAN *et al.*, 2019). Sendo que no presente trabalho, verificamos a presença de fungos apenas após 10 dias de experimento. Ressalta-se que as condições de armazenamento foram diferentes, a temperatura de acondicionamento foi de 5°C. Khan *et al.* (2019) inferem que o parâmetro da temperatura de armazenamento está relacionado com a qualidade do fruto e com a vida de prateleira dos morangos.

Figura 42 - Grupo de morangos no dia do procedimento da sanitização com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm (A) e após 15 dias (B), evidenciando a decadência visual (C) e infecção fúngica aparente (D).



Fonte: Autora (2024).

Os morangos da aplicação do ME-BRANCO passaram a apresentar no tempo de análise de 7 dias, lesões visíveis, escurecimento e perda de firmeza, respondendo com 66,67% de taxa de deterioração. Com 10 dias, a taxa manteve-se, e com 15 dias elevou-se para 100,0% (Tabela 33).

Os morangos da aplicação do OE-PB e ME-PB não apresentaram nenhum tipo de alteração da estrutura, não observou-se sinais de decadência visual, muito menos o desenvolvimento de fungos aparentes (Tabela 33).

Khan *et al.* (2019) concluíram também que morangos com revestimento antimicrobiano comestível produzido a partir de quitosana apresentaram menor deterioração do que os do grupo controle. Os morangos revestidos apresentaram sinais de decomposição após 6 dias de armazenamento, enquanto no presente estudo tais sinais iniciaram-se no 7º dia.

Sobre a firmeza dos morangos, Guerreiro *et al.* (2015) comentam que esta característica tem tendência a diminuir durante o armazenamento em decorrência da

degradação da parede celular e perda de turgor, e que este é um parâmetro de qualidade satisfatório para frutas frescas. Os pesquisadores observaram que a aplicação de revestimentos a base polissacarídeos, alginato de sódio e pectina, e compostos presentes em óleos essenciais, citral e eugenol, melhoraram a firmeza de morangos em comparação ao grupo controle. No entanto, eles ressaltam que a adição de mais que 0,3% de citral interferiu negativamente na firmeza dos morangos, e concluíram que a concentração de determinados compostos de óleos essenciais, que são inseridos nas formulações dos revestimentos pode acarretar na redução da firmeza do fruto.

Tabela 34 - Avaliação da decadência visual, infecção fúngica aparente e taxa de apodrecimento dos grupos de morangos após aplicação do óleo essencial e da microemulsão de *Pectis brevipedunculata*.

GRUPOS DE MORANGOS DA APLICAÇÃO	TEMPO 0	TEMPO 3 DIAS	TEMPO 7 DIAS	TEMPO 10 DIAS	TEMPO 15 DIAS
OE-PB	-	-	-	-	-
ME-PB	-	-	-	-	-
ME-BRANCO	-	-	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura 66,67%	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura 66,67%	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura 100,00%
MORANGO SANITIZADO	-	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura 16,67%	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura 50,00%	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura; Infecção fúngica aparente 66,67%	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura; Infecção fúngica aparente 83,33%
MORANGO NÃO SANITIZADO	-	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura 50,00%	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura 75,00%	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura; Infecção fúngica aparente 100,00%	Lesão visível; Escurecimento; Modificação da textura; Infecção fúngica aparente 100,00%

Fonte: Autora (2024).

Os morangos que tiveram o uso do OE-PB apresentaram uma característica diferente dos demais grupos sem o emprego do OE, a aparência desses morangos foi alterada em virtude da tonalidade tornar-se menos intensa, em comparação aos morangos sem aplicação do produto natural (Figura 43).

O grupo de morangos da aplicação da microemulsão ME-PB apresentou características semelhantes ao grupo que recebeu o OE-PB, em relação à cor. Características estas que não foram visualizadas no grupo do ME-BRANCO, o que

propõe que a alteração da cor foi causada pelo OE, presente também na ME, e não os tensoativos da ME.

Figura 43 - Grupo de morangos no dia do procedimento (A), com 3 (B), 7 (C), 10 (D) e 15 (E) dias após aplicação do óleo essencial de *Pectis brevipedunculata*.



Fonte: Autora (2024).

Horison *et al.* (2019), ao avaliar o revestimento de morango com nanoemulsão de óleo de semente de noz-moscada e quitosana, também observaram mudança de coloração dos frutos, no entanto, a alteração observada foi da passagem do vermelho claro para o vermelho escuro. Os mesmos complementaram que mesmo com a incorporação no fruto, manteve-se a rigidez e a cor da pele após 5 dias de revestimento.

As antocianinas, que são os pigmentos responsáveis pela cor de morangos, apresentam variadas formas estruturais, o cátion flavilium, a base quinoidal, o carbinol pseudobase e a chalcona, que apresentam diferentes colorações. Essas estruturas podem ser afetadas por alguns fatores, como a temperatura, pH, presença de luz, oxigênio, enzimas e possíveis ligações com outras substâncias químicas (BORDIGNON *et al.*, 2009; WANG; ZHANG; WU, 2015).

Durante o armazenamento, a alteração desses parâmetros pode causar a oxidação ou outros tipos de reações químicas envolvendo as antocianinas, o que pode significar a modificação da sua síntese ou instabilidade desses compostos e resultar na substituição da cor vermelha característica do morango por pigmentos acastanhados, opacos ou na descoloração do fruto (WANG; ZHANG; WU, 2015).

O pH consiste em um fator importante na estabilidade da antocianina e na expressão da cor. Pequenas alterações do pH podem afetar as estruturas químicas das antocianinas, e produzir alguma degradação irreversível, causando desbotamento da cor (HOLCROFT; KADER, 1999).

Holcroft e Kader (1999) observaram a cor de morangos sofrendo um empalidecimento ou ‘branqueamento’ em decorrência do aumento do pH, em virtude da dissolução dos altos teores do gás CO₂ utilizado na atmosfera modificada criada.

Guerreiro *et al.* (2015) comentam sobre as concentrações de componentes nos revestimentos antimicrobianos, e os danos que as altas concentrações de substâncias podem causar nas células da epiderme do morango, além das possíveis reações químicas que podem ocorrer entre os compostos da formulação. Em seus estudos, esses fatores resultaram na redução da firmeza e aumento da perda de peso do fruto.

Considerando o embasamento exposto, pode-se inferir que a mudança de coloração dos frutos no presente estudo foi causada pelo acréscimo no valor do pH após aplicação do OE-PB e ME-PB, que pode ser verificado na Tabela 32, e pela concentração do óleo incorporado na micromulsão. O aporte teórico justifica a influência do pH na expressão da cor pelas antocianinas, contudo, há necessidade de comprovar o efeito da concentração dos compostos na coloração do fruto. O que pode ser considerado como perspectiva futura a incorporação de um percentual inferior de óleo essencial no sistema microemulsionado e a observação da manutenção da cor.

Mesmo com o surgimento de uma coloração mais pálida em detrimento do vermelho intenso próprio do morango e um tom de verde mais escuro nas folhas (Figura 43), não constatou-se a presença de fungos aparentes no período do experimento, ou seja, a aplicação do OE-PB e da ME-PB gerou a modificação dessa característica visual, mas não afetou a vida de prateleira, pois os princípios ativos contidos no OE e na ME impediram a proliferação de fungos.

A eficácia desses bioprodutos (OE-PB e ME-PB) é comprovada quando compara-se esses resultados com os obtidos da aplicação do sanitizante frequentemente utilizado na higienização de frutos (o hipoclorito de sódio), que com 3 dias já possibilitou o surgimento de áreas escuras no fruto, sinalizando o desenvolvimento de microrganismos, e com 10 dias possibilitou o crescimento de fungos (Figura 42). Portanto, infere-se que o OE-PB e a ME-PB atuam de forma mais eficiente para inibir o crescimento de microrganismos que a solução de hipoclorito de sódio a 200ppm.

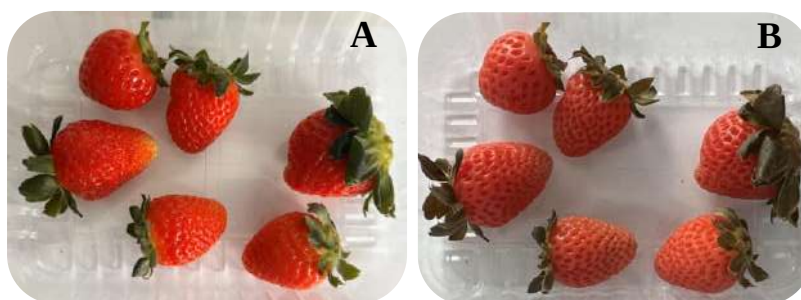
É importante destacar que foram seguidas as recomendações do fabricante (Peterfrut, Espírito Santo, Brasil), contidas na embalagem dos morangos, em se tratando da conservação, que deve ser realizada em refrigeração de 2 a 5°C e que os frutos devem ser lavados antes do consumo, no caso do experimento, os morangos foram não apenas lavados, mas sanitizados, antes do acondicionamento para avaliação. O fabricante ainda faz a ressalva de que o consumo deve ser realizado em até 10 dias.

Acrescenta-se que foi visualizado no grupo da aplicação da formulação (ME-PB) a presença de um líquido na embalagem de acondicionamento dos morangos. Infere-se

que este líquido tende a ser a microemulsão utilizada, por ter coloração semelhante à esta. Sugere-se que por esta formulação ser mais viscosa que o OE, não obteve facilidade em ser drenada pelo filtro de nylon na etapa de secagem do material, e resultou em um excesso da amostra nos frutos.

A fim de observar se outra forma de aplicação da amostra iria demonstrar resultados diferentes, em relação ao excesso da amostra na embalagem, e também em relação à mudança de coloração dos morangos, experimentou-se a forma de aplicação por *spray*, onde utilizou-se um recipiente de 100mL (Manancial do Brasil Importação e Comércio Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) com válvula *spray* para pulverizar as amostras nos frutos. Após aplicação, notou-se que foi possível uma aplicação uniforme das amostras. No entanto, com o passar dos dias, a mudança de coloração aconteceu, obtendo-se morangos mais claros, da mesma forma que na aplicação por imersão (Figura 44).

Figura 44 - Grupo de morangos no dia do procedimento (A) e com 3 dias (B) após aplicação por *spray* do óleo essencial de *Pectis brevipedunculata*.



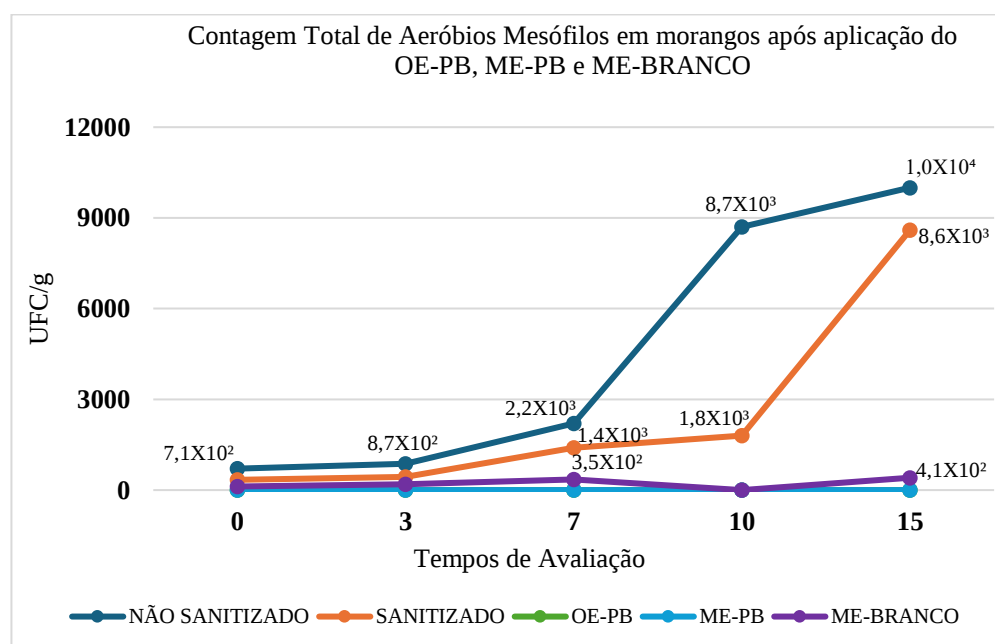
Fonte: Autora (2024).

Ainda da aplicação por *spray*, acrescenta-se que no tempo de 7 dias após a pulverização das amostras, notou-se a presença de uma pequena quantidade de líquido sob os frutos, no entanto, este líquido apresentava coloração avermelhada, diferenciando-se do líquido observado na aplicação por imersão nas amostras. Com base nos resultados obtidos, sugere-se que em ensaios com formulações que sejam viscosas, que a aplicação ocorra por *spray*, visando impedir excesso de amostras no estudo.

Por meio da Contagem Total de Aeróbios Mesófilos em placas verificou-se a qualidade dos morangos em relação às bactérias e a vida de prateleira. A investigação evidenciou que o grupo de morangos que não foi sanitizado apresentou o maior índice de bactérias em todo o período de avaliação, com a proliferação aumentado de $7,1 \times 10^2$ a $1,0 \times 10^4$ UFC/g, do primeiro ao último dia de observação (Figura 42; Tabela 35). Na sequência, o grupo dos morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a

200ppm apresentaram os maiores números de colônias de aeróbios mesófilos, elevando-se de $3,4 \times 10^2$ a $8,6 \times 10^3$ UFC/g. Esse dado mostrou que a sanitização com hipoclorito de sódio foi insuficiente para eliminar os microrganismos aderidos aos frutos. Sendo necessário a implementação de um produto antimicrobiano alternativo, como é o caso dos produtos naturais propostos aqui. Nos grupos de morangos que receberam as aplicações do OE-PB e da ME-PB não foram visualizadas colônias de bactérias nas placas analisadas em todos os tempos do experimento, significando que o OE-PB e a ME-PB foram capazes de inibir o desenvolvimento do microrganismo nos frutos testados. E os morangos que foram submersos no ME-BRANCO desenvolveram bactérias em quase todos os tempos, o que comprova que a ação antimicrobiana é desenvolvida pelos princípios ativos presentes no OE-PB e que foram incorporados na ME-PB e não pelos tensoativos inseridos na formulação. Os morangos da aplicação do ME-BRANCO apresentaram colônias de $1,2 \times 10^2$ a $4,1 \times 10^2$ UFC/g no período do experimento (Figura 45; Tabela 35). Não houve crescimento de aeróbios mesófilos no controle do meio.

Figura 45 - Gráfico da Contagem Total de Aeróbios Mesófilos em placas com morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos submetidos à aplicação do OE-PB, ME-PB e ME-BRANCO, em todos os tempos de avaliação.



Fonte: Autora (2024).

Tabela 35 - Contagem Total de Aeróbios Mesófilos em placas com morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos submetidos à aplicação do OE-PB, ME-PB e ME-BRANCO, em todos os tempos de avaliação.

TEMPO Dias	NÃO SANITIZADO	SANITIZADO	OE-PB UFC/g	ME-PB	ME-BRANCO
0	7,1X10 ²	3,4X10 ²	0	0	1,2X10 ²
3	8,7X10 ²	4,4X10 ²	0	0	1,9X10 ²
7	2,2X10 ³	1,4X10 ³	0	0	3,5X10 ²
10	8,7X10 ³	1,8X10 ³	0	0	0
15	1,0X10 ⁴	8,6X10 ³	0	0	4,1X10 ²

Fonte: Autora (2024).

Comparando-se os resultados alcançados com os de outros pesquisadores, checamos que Khan *et al.* (2019), que pesquisaram revestimento antimicrobiano a base de quitosana, também constataram que o número de microrganismos elevou-se ao longo do período de armazenamento, em particular no grupo controle, que foi de 2,4X10² a 2,1X10⁵ UFC/g (2,43 e 5,3 log UFC/g), sendo estes valores superiores aos identificados no presente estudo. Os pesquisadores concluíram que utilizando o revestimento antimicrobiano proposto por eles, desenvolveu um número inferior de microrganismos, no entanto, ainda houve o surgimento de 1,1x10² a 2,2x10³ UFC/g de aeróbios mesófilos nos morangos. Horison *et al.* (2019) também verificaram que morangos do grupo controle, armazenados a 10°C por 5 dias, apresentaram um quantitativo de bactérias mesófilas, 2,4X10³ UFC/g (3,37±0,02 log UFC/g), mais elevado que os morangos imersos em nanoemulsão de óleo de semente de noz-moscada, com quitosana e Tween 80, que foi de 2,7X10² UFC/g (2,41±0,01 log UFC/g).

Guerreiro *et al.* (2015) na contagem de mesófilos aeróbicos do grupo controle de morangos identificaram de 8,4X10² a 4,2X10⁵ UFC/g (2,9 a 5,6 log 10 UFC/g) colônias. E no grupo de morangos revestidos com a formulação de Alginato de sódio 2% + Citral 0,15% + Eugenol 0,10%, a contagem reduziu de 8,4X10² UFC/g (2,9 log 10 UFC/g a zero) a zero colônias de aeróbios mesófilos.

Enquanto no presente estudo, não houve crescimento de microrganismos nos grupos de morangos da aplicação do OE-PB e ME-PB em nenhum dos tempos do experimento. Assim, considera-se que os nossos resultados estão mais promissores do que os dispostos na literatura.

Horison *et al.* (2019) comentam que o encapsulamento de óleo essencial em nanoescala pode otimizar a ação antimicrobiana, pois há uma maior concentração dos princípios bioativos na região onde os microrganismos estão presentes.

No presente estudo, a situação observada no tempo 10 após aplicação do ME-BRANCO, que houve uma redução significativa do crescimento de microrganismos e no tempo seguinte, de 15 dias, voltou o crescimento a ascender, também foi observado por Guerreiro *et al.* (2015), nos tempos de 7 e 14 dias do experimento com morangos revestidos com formulações a base de Alginato de sódio e de Pectina.

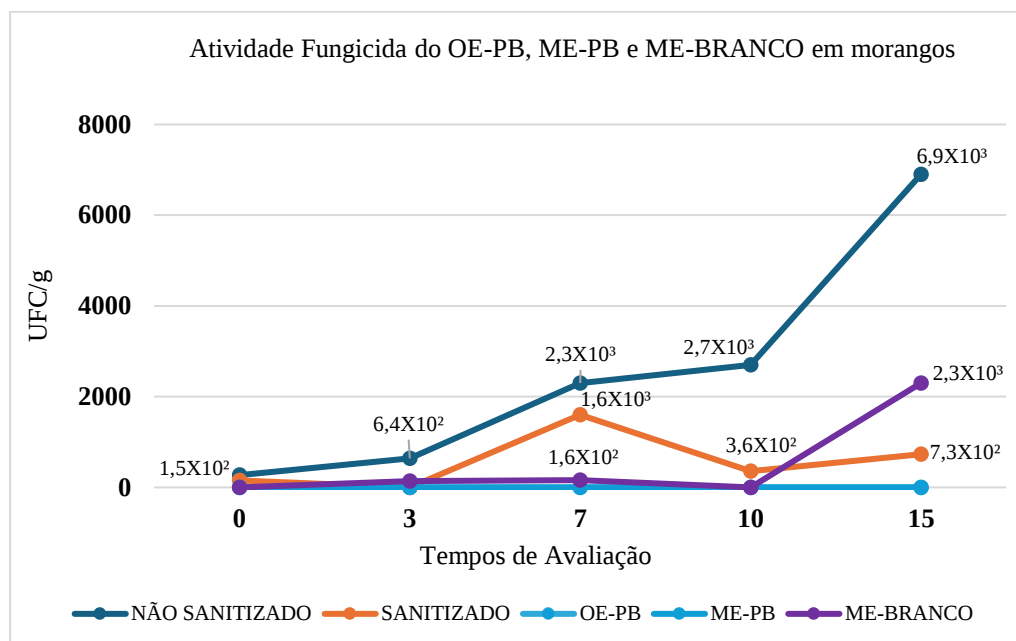
Nos grupos de morangos foi analisado também a presença de infecção fúngica (Tabela 36; Figuras 43 e 44). Com a técnica de enumeração de bolores e leveduras e o método de plaqueamento em profundidade constatou-se que a proliferação fúngica mais intensa ocorreu nos morangos que não foram sanitizados. Nesse grupo, verificou-se em todo o período de avaliação o maior número de colônias de fungos, que iniciou-se com $2,7 \times 10^2$ UFC/g no tempo 0 e elevou-se até atingir $6,9 \times 10^3$ UFC/g no 15º dia do experimento. O grupo dos morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio também ganhou destaque por apresentar fungos em praticamente todos os tempos de avaliação. No primeiro tempo de análise este grupo apresentou $1,5 \times 10^2$ UFC/g, que foi reduzido a zero no tempo de 3 dias, com 7 dias o valor elevou-se para $1,6 \times 10^3$ UFC/g, com 10 dias houve uma nova redução do número de fungos, $3,6 \times 10^2$ UFC/g, e no último tempo de análise o valor aumentou, atingindo $7,3 \times 10^2$ UFC/g. Os morangos que foram submersos na aplicação do OE-PB e da ME-PB não apresentaram infecção fúngica, indicando a ação tanto do OE quanto da formulação em relação à bolores e leveduras. E os morangos que receberam o ME-BRANCO desenvolveram fungos com 3 dias ($1,4 \times 10^2$ UFC/g), 7 dias ($1,6 \times 10^2$ UFC/g) e com 15 dias ($2,3 \times 10^3$ UFC/g) (Tabela 36; Figuras 46 e 47). Não houve crescimento de fungos no controle do meio.

Tabela 36 - Proliferação de fungos em morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos submetidos à aplicação do OE-PB, ME-PB e ME-BRANCO, em todos os tempos de avaliação.

TEMPO Dias	NÃO SANITIZADO	SANITIZADO	OE-PB UFC/g	ME-PB	ME-BRANCO
0	$2,7 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	0	0	0
3	$6,4 \times 10^2$	0	0	0	$1,4 \times 10^2$
7	$2,3 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	0	0	$1,6 \times 10^2$
10	$2,7 \times 10^3$	$3,6 \times 10^2$	0	0	0
15	$6,9 \times 10^3$	$7,3 \times 10^2$	0	0	$2,3 \times 10^3$

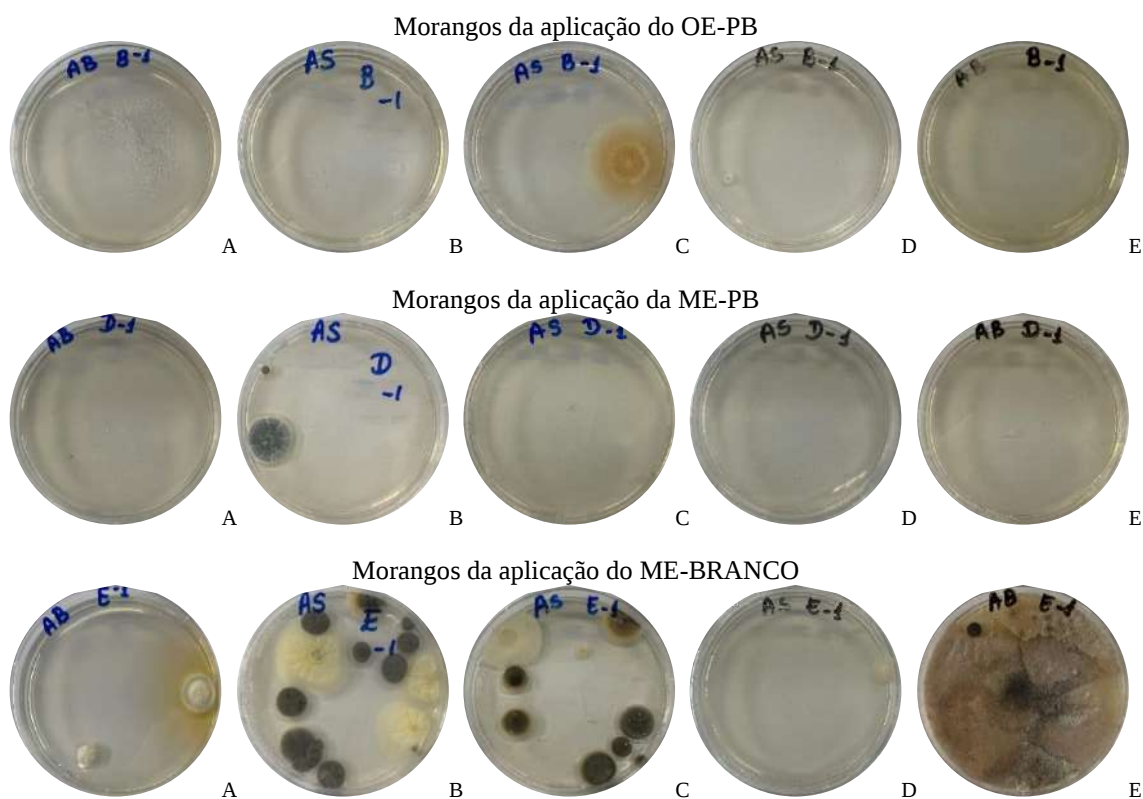
Fonte: Autora (2024).

Figura 46 - Gráfico da proliferação de fungos em morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos submetidos à aplicação do OE-PB, ME-PB e ME-BRANCO, em todos os tempos de avaliação.



Fonte: Autora (2024).

Figura 47 - Avaliação da proliferação de fungos provenientes dos morangos da aplicação do OE-PB, da aplicação da ME-PB, da aplicação do ME-BRANCO, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm e morangos não sanitizados, no tempo zero (A), com 3 (B), 7 (C), 10 (D) e 15 (E) dias após o procedimento.





Fonte: Autora (2024).

Os morangos apresentam uma predisposição a contaminação por bolores e leveduras. Fatores como elevados teores de açúcares e demais nutrientes; atividade de água ideal para crescimento microbiano; baixo pH; apresentam uma camada superficial frágil, que pode ser danificada com certa facilidade, possibilitam o surgimento e crescente desenvolvimento de bolores e leveduras (VU *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2019).

A fim de conferir os resultados adquiridos com os presentes na literatura, checamos que Khan *et al.* (2019) também notaram aumento do número de colônias de bolores e leveduras em morangos com o passar do tempo, derivando de $2,1 \times 10^2$ para $3,3 \times 10^6$ UFC/g (2,34 e 6,49 log UFC/g). Os pesquisadores registraram inicialmente valores menores do que os anotados por nós, mas no final do teste alcançaram valores superiores ao encontrado no presente estudo, pois obtivemos no último tempo de avaliação o equivalente a $6,9 \times 10^3$ UFC/g. E em morangos com revestimento antimicrobiano, Khan *et al.* (2019) enumeraram de $1,6 \times 10^2$ a $1,1 \times 10^5$ UFC/g (2,22 e 5,04 log UFC/g). Horison *et al.* (2019) encontraram nos morangos revestidos, armazenados a 10°C e por 5 dias, fungos da ordem de $6,3 \times 10^2$ UFC/g (2,78 log UFC/g). Guerreiro *et al.* (2015) perceberam no período de 14 dias em morangos revestidos com a formulação de Pectina 2% + Citral 0,15% + Eugenol 0,10% a redução de fungos, de $3,0 \times 10^2$ a $2,1 \times 10^1$ UFC/g (2,5 a 1,3 log 10 UFC/g). Enquanto nos morangos da aplicação do OE-PB e ME-PB não houve crescimento e proliferação de fungos. O que demonstra o potencial do óleo essencial e microemulsão testados.

Guerreiro *et al.* (2015) ainda observaram em um dos seus revestimentos a mesma situação ocorrida no tempo 10 após aplicação do ME-BRANCO do presente estudo, que

houve uma redução significativa do crescimento de microrganismos e no tempo seguinte, de 15 dias, voltou o crescimento a ascender.

De acordo com os resultados, no tempo zero do experimento, ou seja, 01h após a aplicação das amostras, houve a presença de aeróbios mesófilos em todos os grupos de tratamento, com exceção do grupo da imersão no OE-PB e na ME-PB. E em relação aos fungos, no tempo inicial também foi isento de fungos apenas no grupo do OE-PB, ME-PB e do ME-BRANCO. Tal constatação evidencia que as amostras, tanto do óleo, quanto da formulação foram eficientes em eliminar os microrganismos em um tempo curto, de 01 hora, que foi o período considerado como tempo zero. Essa situação também foi observada por Khan *et al.* (2019), que mostraram que no tempo zero dos seus estudos, quando aplicaram o revestimento antimicrobiano o nível de aeróbios mesófilos e de bolores e leveduras foi minimizado.

A presença de microrganismos, como bolores e leveduras, e bactérias mesófilas, em frutas frescas, como o morango, é relatado na literatura. Colônias de 10^3 a 10^9 UFC/g desses microrganismos podem se originar no campo, no momento da colheita, ou no transporte, na comercialização ou até durante a manipulação pelo consumidor. Assim, há a possibilidade de frutos *in natura* chegarem até o consumidor já com a presença de uma carga microbiana, que deve ser eliminada com o procedimento da sanitização (ALVES *et al.*, 2019; TOURNAS; KATSOUUDAS, 2005).

Notou-se que a quantidade de fungos presentes no tempo inicial do experimento foi eliminada pela sanitização. Além disso, o sanitizante evitou nova proliferação com 3 dias. No entanto, com 7 dias, o hipoclorito de sódio não conseguiu conter o desenvolvimento do microrganismo. De acordo com Rodrigues *et al.* (2011), o sanitizante consegue reduzir apenas até dois ciclos logarítmicos da carga de microrganismos. Essa redução da microbiota competitiva pode possibilitar o desenvolvimento de patógenos.

No presente estudo, foram identificados nos morangos os gêneros de fungos: *Curvularia*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Purpureocillium* e *Talaromyces* (Figura 45). A identificação dos fungos ocorreu após 7 dias de crescimento, onde foram observados as características macroscópicas (Tabela 37): diâmetro, textura, pigmentação, superfície, borda, topografia, cor, aspecto, pigmento e crescimento; e as características microscópicas das estruturas morfológicas (Tabela 38): hifa, conídio, conidióforo, fialide, célula pé e vesícula. A identificação dos fungos filamentosos a nível do gênero, seguiu as recomendações do livro “*Larone’s medically important fungi: a guide to identification*” (LARONE *et al.*, 2018).

Dos fungos detectados, alguns são definidos na literatura como os mais comuns encontrados em morangos, como é o caso dos fungos dos gêneros *Penicillium* e *Cladosporium*. Esses fungos originam doenças no fruto, associadas a fermentos pós-colheita (TOURNAS; KATSLOUDAS, 2005). Souza (2017) cita as espécies *Penicillium expansum*, *Penicillium purpurogenum* e *Aspegillus niger* como as principais fitopatogênicas causadoras de deterioração avançada nos morangos. Os fungos pertencentes ao gênero *Talaromyces* merecem um certo destaque, pois são capazes de produzir esporos termorresistentes, e por esta razão conseguem sobreviver aos tratamentos térmicos do processamento de alimentos (MÜLLER; SILVA, 2019).

Tournas, Heeres e Burgess (2006) também identificaram a presença de *Cladosporium* em saladas de morango. Tournas e Katsoudas (2005) verificaram que espécies fúngicas de *Cladosporium* criaram manchas escuras e fungos de *Penicillium* produziram uma podridão mole em morangos, que foram cobertos com conídios verdes ou azulados e com odor forte e desagradável. Souza (2017) identificou a espécie fúngica *Purpureocillium lilacinus* em sistemas de cultivo de morangueiro. O fungo foi obtido a partir de *Lobiopa insularis*, uma das principais pragas da cultura de morangueiros. Da mesma forma, foram identificados os fungos do gênero *Talaromyces* (*T. amestolkiae* e *T. verruculosus*), *Aspergillus* (*Aspergillus nomius* e *Aspergillus westerdijkiae*), e *Penicillium* (*Penicillium brasilianum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium commune*, *Penicillium janthinellum* e *Penicillium paxilli*). Esses gêneros também foram registrados no presente trabalho.

A literatura não menciona o gênero *Curvularia* encontrado em morangos. Muitas das espécies desse gênero de fungo são patogênicas, sendo responsáveis por uma variedade de doenças em plantas, originam frequentemente manchas foliares e causam perdas na produção agrícola (SANTOS *et al.*, 2018). As características morfológicas identificadas no presente estudo estão conforme o citado por Santos *et al.* (2018).

Tabela 37 - Características macroscópicas dos fungos com 7 dias de crescimento em meio SDA (Ágar *Sabouraud* dextrose) a 25±3°C, isolados de morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos após aplicação do óleo essencial (OE-PB), microemulsão (ME-PB) de *Pectis brevipedunculata* e branco da microemulsão (ME-BRANCO).

Fungo	Diâmetro (mm)	Textura	Pigmentação	Superfície	Borda	Topografia	Cor	Aspecto	Pigmento	Crescimento
1	7,50	Aveludada	Inalterada	Lisa e cinza	Regulares	Plana	Verde musgo escuro	Seco	Ausência	Rápido
2	1,00	Camurça	Inalterada	Fissurada	Irregulares e brancas	Pregueada, centro umbilicado	Verde	Opaco	Ausência	Lento
3	4,50	Pulverulenta	Inalterada	Lisa	Irregulares	Plana	Preta	Úmido	Ausência	Rápido
4	6,50	Coriáceas	Inalterada	Rugosa	Regulares	Plana	Amarela, centro marrom	Brilhante	Ausência	Rápido
5	3,00	Aveludada	Inalterada	Fissurada	Regulares e brancas	Plana, centro pregueado	Verde	Opaco	Ausência	Rápido
6	4,50	Camurça	Inalterada	Fissurada	Irregulares e amarelas	Pregueada, centro umbilicado	Branca	Opaco	Presença, amarelo	Rápido
7	2,30	Algodonosa	Inalterada	Lisa	Irregulares	Umbilicada	Branca, centro roxo	Opaco	Ausência	Rápido
8	2,00	Camurça com borda coriácea	Alterada	Lisa	Irregulares e brancas	Umbilicada	Verde, centro vermelho	Opaco	Presença, vermelho	Rápido
9	5,30	Pulverulenta	Inalterada	Rugosa	Regulares	Umbilicada	Preta, centro branco	Opaco	Ausência	Lento
10	3,00	Camurça	Inalterada	Fissurada	Irregulares	Pregueada, centro umbilicado	Branca	Opaco	Ausência	Lento

Fonte: Autora (2024).

Tabela 38 - Características microscópicas dos fungos isolado de morangos não sanitizados, morangos sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm, e morangos após aplicação do óleo essencial (OE-PB), microemulsão (ME-PB) de *Pectis brevipedunculata* e branco da microemulsão (ME-BRANCO).

Fungo	Hifa	Conídio	Conidióforo	Fialide	Célula pé	Vesícula
1	Septada e escuras	Septado, escuro	Curto, septado e escuro	Ausente	Presente	Ausente
2	Septada, escura	Bastão, circulares, escuro			Presente	
3	Ausente	Redondo, liso, escuro	Longo, escuro	+ 7	Ausente	Irradiada
4	Septada, hialina	Redondo, hialino	Curto, septado	+ 7	Presente	Achatada
5	Septada, hialina	Redondo, liso, hialino	Curto, septado, hialino	3 a 5	Presente	Ausente
6	Septada, hialina	Redondo, hialino, liso	Curto/Longo, septado, hialino	3 a 4	Presente	
7	Septada, hialina	Circulares, liso, hialino	Longo	3 a 5	Presente	Ausente
8	Lisa, hialina, septada	Liso, esférico, hialino	curto, liso, hialino	3 a 5	Presente	Ausente
9	Ausente	Redondo, escuro	Longo, escuro	Ausente	Ausente	Irradiada
10	Septada, hialina	Redondo, liso, hialino	Curto, septado	3 a 4	Presente	Ausente

Fonte: Autora (2024).

Nota: ND: Não determinado.

Figura 48 - Características macroscópicas (verso e anverso) das colônias com 7 dias de crescimento em meio SDA (Ágar *Sabouraud* dextrose) acidificado, a $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotografia de microscopia óptica 40x com características microscópicas dos gêneros de fungos filamentosos identificados.

Fungo 1 - *Curvularia*



Fungo 2 - *Cladosporium*

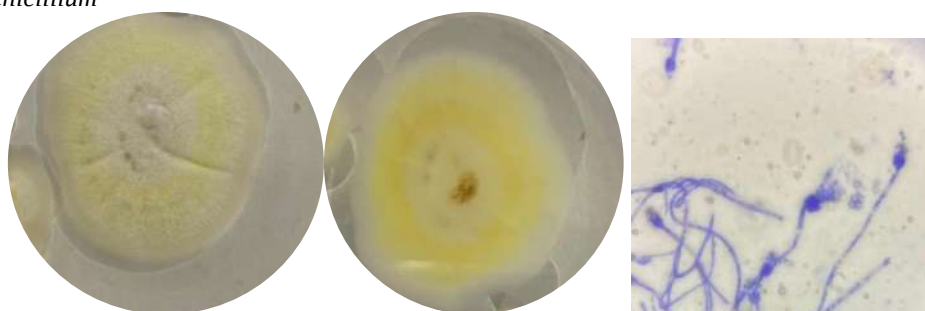
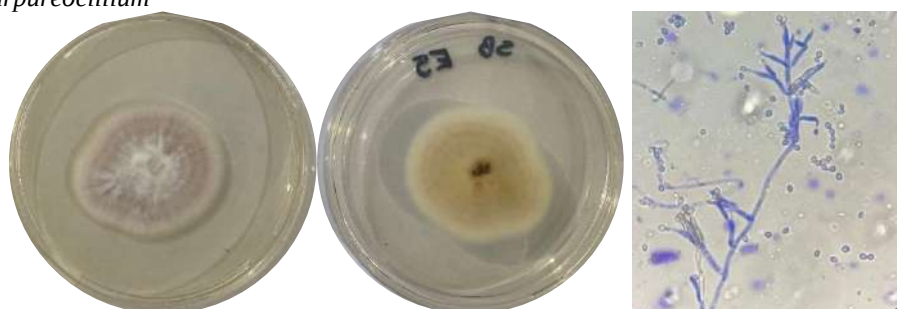
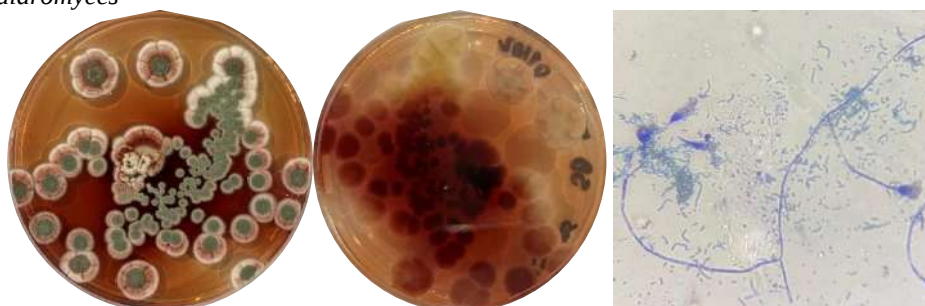


Fungo 3 - *Aspergillus*

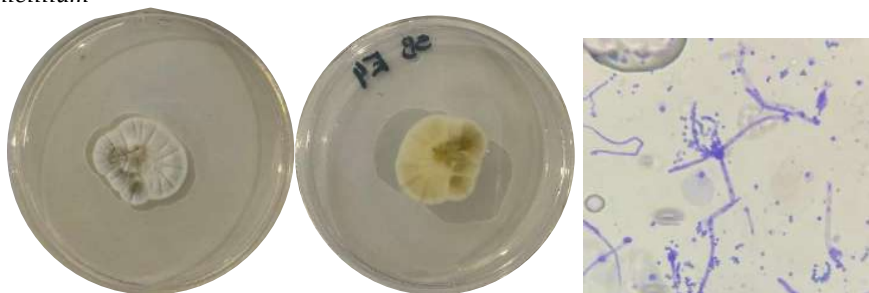


Fungo 4 - *Aspergillus*



Fungo 5 – *Penicillium***Fungo 6- *Penicillium*****Fungo 7 – *Purpureocillium*****Fungo 8 - *Talaromyces*****Fungo 9 - *Aspergillus***

Fungo 10 - *Penicillium*



Fonte: Autora (2024).

Alguns dos fungos citados podem produzir micotoxinas causando riscos à saúde, como o desenvolvimento de alergias (TOURNAS; KATSODAS, 2005). Há relatos na literatura de que espécies de fungos de *Penicillium* e *Aspergillus* podem crescer e produzir micotoxinas em temperatura ambiente e até em baixas temperaturas (TOURNAS; KATSODAS, 2005). Com esses dados, conclui-se que o controle antifúngico em morangos deve ser rigoroso e é necessário a busca e implementação de novas medidas, como o uso de produtos naturais.

O OE-PB, assim como a formulação ME-PB, apresentam entre os compostos majoritários o citral. O citral desempenha atividade biológicas, como a atividade fungicida. Marques *et al.* (2013) testou a ação do OE de *P. brevipedunculata* contra fungos (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton rubrum*), confirmando a atividade inibitória do OE de *P. brevipedunculata*. Corrêa *et al.* (2023) avaliaram o efeito do OE de *P. brevipedunculata* no controle do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, em mangas, concluindo que o OE é eficiente no controle de doenças fúngicas na manga.

O citral desenvolve mecanismos antifúngicos capazes de alterar a morfologia das hifas e distorção do micélio, aumentar a permeabilidade da membrana dos fungos, causando a liberação de constituintes celulares, vazamento de íons potássio, induzir a diminuição no conteúdo total de lipídios e ergosterol das células, indicando a ruptura da integridade da membrana (TAO; LEI JIA, 2014).

O composto Limoneno, também classificado entre os compostos majoritários do OE-PB, tem atividade fungicida, sendo eficiente na inibição de espécies de *Aspergillus*, podendo inibir totalmente o crescimento de *Aspergillus flavus*, um fungo produtor de aflatoxina, na concentração de 500 ppm (VU *et al.*, 2011).

Com base nos resultados apresentados, infere-se que o OE-PB e a ME-PB apresentaram atividade antifúngica promissora, ampliando a vida útil dos morangos durante o armazenamento. Estudos adicionais são necessários para otimizar a aplicação do OE e da ME-PB desenvolvida a fim de utilizá-los como material de revestimento na indústria alimentícia.

5 CONCLUSÃO

A incorporação de produtos naturais, como os óleos essenciais extraídos de *D. stelechantha* e de *P. brevipedunculata*, em microemulsões otimiza a biodisponibilidade de princípios bioativos, potencializando atividades biológicas, como a ação antimicrobiana e antileishmania, e ainda otimiza o efeito antioxidante.

Os efeitos desempenhados pelos principais compostos detectados na caracterização química no OE de *D. stelechantha*, α -pineno, β -pineno e espatulenol, e no OE de *P. brevipedunculata*, α -pineno, limoneno, neral e geranial, foram melhorados pelas suas incorporações nas microemulsões.

A avaliação da atividade antimicrobiana pelo método da diluição em caldo evidenciou que as formulações desenvolvidas apresentaram menor concentração inibitória, quando comparadas aos OEs, e foram consideradas com forte inibição frente às bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium* spp. Da mesma forma, as microemulsões apresentaram concentrações de antioxidantes mais elevadas que os OEs, tanto pelo método DPPH quanto pelo ABTS. Na investigação da citotoxicidade, os sistemas microemulsionados reduziram a toxicidade celular e foram mais seletivos que os OEs para a inibição de promastigotas de *Leishmania* (L.) *amazonensis*. Assim, comprovou que as formulações compostas com produtos naturais podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novos fármacos. E na aplicação das microemulsões desenvolvidas em morangos, as microemulsões conseguiram inibir a proliferação de aeróbios mesófilos e fungos, atuando na conservação dos morangos, estendendo a vida de prateleira destes alimentos.

As atividades biológicas promovidas pelas microemulsões estão diretamente relacionadas à maior biodisponibilidade dos princípios ativos presentes nos óleos essenciais incorporados, e não pelos tensoativos utilizados na formulação. Conclui-se que as microemulsões das espécies pesquisadas possuem potencial biotecnológico a ser explorado e configuram-se como alternativas de sistemas para aumentar a estabilidade dos metabólitos, reduzir a toxicidade dos compostos, melhorar a eficácia de fármacos e evitar a deterioração de alimentos.

Este estudo admite a importância de valorizar a biodiversidade Brasileira, e sobretudo, a Maranhense, de onde pode-se prospectar plantas fonte de matéria-prima para o desenvolvimento de bioprodutos. Este estudo demonstrou não apenas o potencial biotecnológico de metabólitos presentes em espécies da nossa flora, mas também as possibilidades para o desenvolvimento de sistemas formulados com a incorporação de produtos

naturais que podem ter finalidade farmacêutica e alimentícia. Tais produções tendem a contribuir cientificamente para o desenvolvimento da região, do país e do Mundo, pois os resultados alcançados dizem respeito à solução de um problema de saúde pública de cunho Mundial, que é a doença Leishmaniose. Esta produção científica contribuirá embasando novas pesquisas com foco em produtos naturais e desenvolvimento de formulações. Este estudo proporciona também impacto social, quando propõe um recurso alternativo para tratar uma doença negligenciada, que o tratamento padronizado apresenta diversas limitações e reações adversas, e que com o novo fármaco deve conferir qualidade de vida à população do Maranhão, que é considerado um dos estados mais afetados pela Leishmaniose entre as Unidades da Federação e é o estado com o menor Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do país. E este estudo deve originar ainda impactos econômicos, haja visto que foi comprovado o efeito das formulações na conservação de alimento, o que deve prolongar a vida útil destes, evitar perdas do gênero alimentício e aumentar o lucro para produtores e comerciantes.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para futuros ensaios, planeja-se incorporar um percentual inferior de óleo essencial no sistema microemulsionado e observar a manutenção da cor dos frutos. Pode-se ainda acrescentar o protocolo de aplicação por *spray*, onde as amostras serão pulverizadas sob a superfície do fruto a fim de formar um revestimento fino e uniforme.

Pretende-se produzir Artigos científicos com os resultados alcançados da aplicação dos OEs e MEs nos morangos e submetê-los à periódicos da área, a fim de divulgar o detalhamento das atividades desenvolvidas neste estudo e embasar novas pesquisas a respeito desta temática ou de outras que possam ser derivadas das discussões presentes neste trabalho.

Como perspectivas futuras, pretende-se ainda completar a investigação da atividade leishmanicida dos óleos essenciais e microemulsões, verificando-se também a ação das amostras frente às formas amastigotas de *Leishmania*. (L.) *amazonensis*, haja visto que foi realizado apenas o ensaio nas formas promastigotas.

Haja vista a importância biotecnológica das espécies investigadas e o potencial para desenvolver bioprodutos, que podem ser empregados na área de química, farmácia, alimentos, entre outras. Almeja-se para etapas posteriores da pesquisa, realizar estudos sobre áreas prioritárias para conservação das espécies e implementar ações que visem orientar, desenvolver e adequar as atividades relacionadas àquelas áreas. Para assim garantir a proteção destas espécies, do meio ambiente e de toda a biodiversidade.

Acredita-se que essas etapas enriquecerão ainda mais este trabalho, promovendo mais impactos científico, social e econômico no país.

7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORAMENTO

Durante o Doutorado, produções científicas foram desenvolvidas a respeito do objeto de estudo e de outros temas relacionados à esta pesquisa. Das produções bibliográficas, destacam-se **(Anexo C)**:

Artigos completos publicados em periódicos:

LOPES, AUXILIADORA CRISTINA CORREA BARATA; DO NASCIMENTO, JESSYANE RODRIGUES ; CAMARA, MARCOS BISPO PINHEIRO ; LIMA, ALDILENE DA SILVA ; LOPES, GLÁUCIA LAÍS NUNES ; DO NASCIMENTO, MATHEUS OLIVEIRA ; XAVIER, JÚLIA KARLA ALBUQUERQUE MELO ; DE JESUS, CAROLINE MARTINS ; MENDONÇA, CÁRITAS DE JESUS SILVA ; CARVALHO, ANDRÉ LUIS MENEZES ; SILVA, LUCILENE AMORIM ; DA ROCHA, CLÁUDIA QUINTINO . Chemical Characterization, Leishmanicidal Activity and In Vitro Cytotoxicity of the Essential Oil Extracted from *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip. and Its Incorporation into Microemulsion Systems. PHARMACEUTICS, v. 16, p. 87, 2024. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics16010087>.

BARATA LOPES, AUXILIADORA C.C.; CAMARA, MARCOS B.P. ; LIMA, ALDILENE S. ; DO NASCIMENTO, MATHEUS OLIVEIRA ; M. XAVIER, JÚLIA KARLA A. ; DE JESUS, CAROLINE M. ; MENDONÇA, CÁRITAS J.S. ; CARVALHO, ANDRÉ LUIS M. ; SILVA, LUCILENE A. ; DA ROCHA, CLÁUDIA Q. . Chemical composition and potential antileishmanial and cytotoxic activity of *Duguetia stelechantha* (Diels) R.E.Fr. essential oil. INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS, v. 202, p. 116978, 2023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116978> .

NASCIMENTO, J. R. ; MIRANDA, A. J. A. ; VIEIRA, F. C. ; RODRIGUES, C. D. P. ; VASCONCELOS, L. N. ; PEREIRA FILHO, J. L. ; TANGERINA, M. M. P. ; VILEGAS, W. ; ROCHA, C. Q. ; **LOPES, A. C. C. B.** . A Review of the Phytochemistry and Pharmacological Properties of the Genus *Arrabidaea*. PHARMACEUTICALS, v. 15, p. 658, 2022. <http://dx.doi.org/10.3390/ph15060658>.

Capítulos de livros publicados:

Lima, Nayara Pereira ; Tempo, Denzel Washihgton Cardoso Bom ; **LOPES, AUXILIADORA CRISTINA CORRÊA BARATA** . PROCESSAMENTO E COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA GELEIA DE ABRICÓ (*Mammea americana* L.). In: Flávio Ferreira Silva. (Org.). Equidade e Sustentabilidade no Campo da Segurança Alimentar Global. 1ed.Ponta Grossa: Atena Editora, 2020, v. , p. 76-84. <http://dx.doi.org/10.22533/at.ed.2472024049>.

Lima, Nayara Pereira ; Tempo, Denzel Washihgton Cardoso Bom ; Silva, Ana Maria ; **LOPES, AUXILIADORA CRISTINA CORRÊA BARATA** . ESTUDO DA ESPÉCIE FRUTÍFERA CAFÉ-DOAMAZONAS (*Bunchosia glandulifera*): CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PROPOSTAS TECNOLÓGICAS DE UTILIZAÇÃO. In: Vanessa Bordin Viera; Juliana Késsia Barbosa Soares; Ana Carolina dos Santos Costa. (Org.). Prática e Pesquisa em Ciência e Tecnologia de Alimentos 4. 1ed.Ponta Grossa: Atena Editora, 2020, v. , p. 92-100. <http://dx.doi.org/10.22533/at.ed.0262027089>.

Apresentações de Trabalho:

LOPES, AUXILIADORA CRISTINA CORREA BARATA; CAMARA, M. B. P. ; LIMA, A. S. ; XAVIER, JÚLIA KARLA ALBUQUERQUE MELO ; DE JESUS, CAROLINE M. ; MENDONÇA, C. J. S. ; SILVA, LUCILENE AMORIM ; ROCHA, C. Q. . Investigação da ação leishmanicida e citotoxicidade *in vitro* do óleo essencial e microemulsão de *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip.. 2024. (Apresentação de Trabalho/Outra). 1º EPQuim UFMA-IFMA: Encontro de Cooperação dos Programas de Pós-Graduação em Química.

LOPES, A. C. C. B.; Bezerra, I. M. B. G. ; ROCHA, C. Q. . Atividade leishmanicida do óleo essencial de *Duguetia stelechantha* incorporado em microemulsão. 2024. (Apresentação de Trabalho/Outra). 1º EPQuim UFMA-IFMA: Encontro de Cooperação dos Programas de Pós-Graduação em Química.

ROCHA, C. Q. ; **LOPES, A. C. C. B.** ; CAMARA, MARCOS B.P. ; LOPES, GLÁUCIA LAÍS NUNES ; DO NASCIMENTO, MATHEUS OLIVEIRA ; XAVIER, JÚLIA KARLA ALBUQUERQUE MELO ; MENDONÇA, C. J. S. ; CARVALHO, ANDRÉ LUIS M. . Potential of microemulsion of essential oil of *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip. against *L. (L.) amazonensis* promastigotes and RAW 264.7 cells. 2024. (Apresentação de Trabalho/Outra). 47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

CAMARA, M. B. P.; CARVALHO, N. A.; MORAES, R. K. C.; LIMA, A. S.; **LOPES, A. C. C. B.**; MENDONÇA, C. J. S.; ROSÁRIO, C. J. R. M.; ROCHA, C. Q. *Pectis brevipedunculata*: investigações sazonais, circadianos, química e no efeito sobre *Rhipicephalus micropus* e *Haemonchus contortus*. 2023. (Apresentação de Trabalho/Simpósio). XIV Simpósio Brasileiro de Farmacognosia.

LOPES, AUXILIADORA CRISTINA CORRÊA BARATA; CAMARA, M. B. P. ; TELES, A. M. ; LIMA, A. S. ; ROCHA, C. Q. . Chemical characterization and antimicrobial evaluation of *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae). 2021. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra). 8th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP).

Palestra:

LOPES, AUXILIADORA CRISTINA CORRÊA BARATA. Aplicação de Óleos Essenciais na Indústria de Alimentos. 2021. (Palestra). I Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos: a diversidade da atuação profissional e pesquisa no Brasil.

Participação em eventos científicos:

1º EPQuim UFMA-IFMA: Encontro de Cooperação dos Programas de Pós-Graduação em Química. 2024. (Encontro).

2º Congresso Brasileiro de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia. 2022. (Congresso).

IV Workshop em Bioanálise e Métodos Alternativos, III Workshop em Bioequivalência de produtos tópicos e I Workshop em Avaliação da permeação cutânea de produtos agroquímicos. 2022.

8th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP) and XXXIV Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (RESEM). Chemical characterization and antimicrobial evaluation of *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae). 2021.

Seminário em Biodiversidade, Conservação e Biotecnologia. 2021. (Seminário).

Simpósio Latino-Americano de Química & V Workshop de Biotecnologia da Rede Bionorte,. 2021. (Simpósio).

Cursos de Formação Complementar:

Determinação estrutural de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico. (Carga horária: 20h). Universidade Federal do Maranhão, UFMA, Brasil. 2024.

Desmistificando a Técnica de Headspace. (Carga horária: 1h). Shimadzu, SHIMADZU, Brasil. 2022.

Análise de óleos essenciais: uma tarefa complexa. (Carga horária: 8h). Sociedade Brasileira de Química, SBQ, Brasil. 2022.

Óleos essenciais: da biossíntese ao cosmético. (Carga horária: 4h). BIONORTE, Brasil. 2022.

Por que microencapsular óleos essenciais? (Carga horária: 4h). BIONORTE, Brasil. 2022.

A Química Verde inserida na bioeconomia baseada no conhecimento. (Carga horária: 2h). Associação Brasileira de Química, ABQ, Brasil. 2021.

Biotecnologia a serviço da sustentabilidade. (Carga horária: 1h). Feira Agrotecnológica do Tocantins, AGROTINS, Brasil. 2020.

Escolha de testes estatísticos para análises biológicas. (Carga horária: 2h). Universidade Federal do Maranhão, UFMA, Brasil. 2020.

Introdução a rede de interações moleculares e utilização da plataforma GNPS. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. 2020.

Óleos essenciais: aspectos gerais. (Carga horária: 1h). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, Brasil. 2020.

Ferramentas automatizadas para desenvolvimento de métodos cromatográficos. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. 2020.

Espectometria de massas: possibilidades experimentais no âmbito do parque instrumental do NuBBE. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. 2020.

Prêmios:

Trabalho premiado na área de Química Orgânica, na Exposição de poster no 1º EPQuim UFMA-IFMA: "Investigação da ação leishmanicida e citotoxicidade in vitro do óleo essencial e microemulsão de *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip. UFMA/IFMA. 2024.

Participação em Bancas de Trabalhos de Conclusão de Curso de Graduação:

ROCHA, C. Q.; ZANANDREA, I.; LOPES, AUXILIADORA CRISTINA CORRÊA BARATA. Participação em banca de Lize Kerly Silva Sousa. Caracterização fitoquímica e avaliação citotóxica do extrato hidroetanólico das folhas de *Krameria Tomentosa* A. St-Hill. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Maranhão.

Demais tipos de produção técnica

LOPES, A. C. C. B.. Avaliador de Trabalhos Científicos do VI Simpósio em Ensino Tecnológico no Amazonas - SETA. 2020. (Avaliador de Trabalhos Científicos).

REFERÊNCIAS

- ABBASI, S.; RADI, M. Food grade microemulsion systems: Canola oil/lecithin:n-propanol/water, **Food Chemistry**, v. 194, p. 972-979, 2016, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.078>.
- ACHARYA, D. P.; HARTLEY, P. G. Progress in microemulsion characterization. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, n.5, p. 274–280, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.07.002>
- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4 ed. Carol Stream, Allured Publishing Corporation, 2007.
- AGGARWAL, N.; GOINDI, S.; KHURANA, R. Formulation, characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105, p. 158–166, 2013, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.01.004>
- AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n.3, 2016, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- ALBUQUERQUE, M. R. J.; MARIA COSTA, S. O.; BANDEIRA, P. N.; MARIA SANTIAGO, G. P.; ANDRADE-NETO, M.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. Nematicidal and larvicidal activities of the essential oils from aerial parts of *Pectis oligocephala* and *Pectis apodocephala* Baker. **Chemical Sciences**, An. Acad. Bras. Ciênc., v.79, n.2, p.209–213, 2007, <https://doi.org/10.1590/S0001-37652007000200003>
- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.9, p. 4168–4170, 2001, <https://doi.org/10.1021/jf001494m>
- ALMEIDA, J. R. G. S.; FACANALI, R.; VIEIRA, M. A. P.; MARQUES, M. O. M.; LÚCIO, A. S. S. C.; LIMA, E. O.; AGRA, M. F. Composition and Antimicrobial Activity of the Leaf Essential Oils of *Duguetia gardneriana* Mart. and *Duguetia moricandiana* Mart. (Annonaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v.22, n.3, p.275–278, 2010.
- ALVES, H.; ALENCAR, E. R.; FERREIRA, W. F. S.; SILVA, C. R.; RIBEIRO, J. L. Microbiological and physical-chemical aspects of strawberry exposed to ozone gas at different concentrations during storage. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.22, 2019, p.1-12, <https://doi.org/10.1590/1981-6723.00218>
- APHA - American Public Health Association. **Compendium of métodos for the microbiological examination of foods**. 4 ed. APHA, Washington, D.C., 2001.
- APHA - American Public Health Association. (2015). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 5 ed. APHA, Washington, D.C., 2015.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and micro-emulsions: Clarifications of the critical differences. **Pharmaceutical Research**, v.28, n.5, p.978–985, 2011, <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0309-1>

ANVERSA, L.; TIBURCIO, M. G. S.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; RAMIREZ, L. E. Human leishmaniasis in Brazil: a general review. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 64, n. 3, p. 281-289, 2018. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.64.03.281>

ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. Insumos Farmacêuticos e Especialidades. 6 ed. v. 2. Brasília, 2019.

ANVISA. **RDC nº 725, de 1º de julho de 2022**. Dispõe sobre os aditivos alimentares aromatizantes. Brasília, 2022.

ANVISA. **Instrução Normativa nº 211, de 1º de março de 2023**. Estabelece as funções tecnológicas, os limites máximos e as condições de uso para os aditivos alimentares e os coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em alimentos. Brasília, 2023.

ARAUJO, S.H.C.; MANTILLA-AFANADOR, J.G.; SVACINA, T.; NASCIMENTO, T.F.; DA SILVA LIMA, A.; CAMARA, M.B.P.; VITERI JUMBO, L.O.; DOS SANTOS, G.R.; DA ROCHA, C.Q.; DE OLIVEIRA, E.E. Contributions of γ -Aminobutyric Acid (GABA) Receptors for the Activities of *Pectis brevipedunculata* Essential Oil against *Drosophila suzukii* and Pollinator Bees. **Plants**, v. 13, p.1-15, 2024, <https://doi.org/10.3390/plants13101392>

ARNON-RIPS, H.; PORAT, R.; POVERENOV, E. Enhancement of agricultural produce quality and storability using citral-based edible coatings; the valuable effect of nano-emulsification in a solid-state delivery on fresh-cut melons model. **Food Chemistry**, v.277, p. 205–212, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.117>

ASSIS, G. B. de. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo óleo essencial de alecrim - *Rosmarinus officinalis* Linn. (Lamiaceae)**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Paraíba, 2014.

ASSUNÇÃO, G. V. de. **Caracterização química e avaliação da atividade larvícida frente ao *Aedes aegypti* do óleo essencial da espécie *Citrus sinensis* L. Osbeck (laranja doce)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, 2013.

AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; CÉSAR, J.; MENOR, A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, 2008, <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000100017>

AZEVEDO, C. S. DE. **Anatomia e ultra-estrutura foliar de *Pectis brevipedunculata*: ontogenia de cavidades secretoras e estrutura Kranz**. 2007. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

BARATA LOPES, A. C. C.; CAMARA, M. B. P.; LIMA, A. S.; DO NASCIMENTO, M. O.; JÚLIA KARLA, J. K. A.; DE JESUS, C. M.; MENDONÇA, C. J. S.; CARVALHO, A. L. M.; SILVA, L. A.; DA ROCHA, C. Q. Chemical composition and potential antileishmanial and cytotoxic activity of *Duguetia stelechantha* (Diels) R.E.Fr. essential oil. **Industrial Crops and Products**, v.202, 2023.<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116978>

BARATA LOPES, A. C.C.; NASCIMENTO, J. R.; CAMARA, M. B.P.; LIMA, A. S.; LOPES, G. L.N.; DO NASCIMENTO, M. O.; XAVIER, J.K.A.M.; DE JESUS, C.M.; MENDONÇA, C.D.J.S.; CARVALHO, A. L.M.; SILVA, L.A.; ROCHA, C. Q. Chemical Characterization, Leishmanicidal Activity and In Vitro Cytotoxicity of the Essential Oil Extracted from *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip. and Its Incorporation into Microemulsion Systems. **Pharmaceutics**, v.16, n.87, 2024, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16010087>

BARBOSA, A. V. **Caracterização química e atividade antimicrobiana e antioxidante de óleos essenciais de plantas da mata atlântica**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2017.

BARBOSA, R. S. S. **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de extratos de fungos endofíticos frente a cepas presentes nas infecções endodônticas**. 2009. Dissertação (Mestrado em Patologia tropical) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

BAY, M.; OLIVEIRA, J. V. S.; SALES JUNIOR, P. A.; MURTA, S. M. F.; SANTOS, A. R.; BASTOS, I. S.; ORLANDI, P. P.; SOUSA JUNIOR, P. T. In Vitro Trypanocidal and Antibacterial Activities of Essential Oils from Four Species of the Family Annonaceae. **Chemistry and Biodiversity**, v.16, n.11, 2019, <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900359>

BASAK, S.; GUHA, P. Betel leaf (*Piper betle* L.) essential oil microemulsion: Characterization and antifungal activity on growth, and apparent lag time of *Aspergillus flavus* in tomato paste, **LWT**, v. 75, p.616-623, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.021>.

BEDIN, A. C. **Nanoemulsões contendo Benzoilmetronidazol: Desenvolvimento, Caracterização e Estudo de Liberação *in vitro***. 2011. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

BEZERRA, A. F. M.; SOUZA, A. D. L. DE; SOUZA, A. Q. L. DE. Triagem qualitativa de bactérias endofíticas isoladas da região amazônica como produtoras de PHA a partir de sacarose. In: I Encontro Amazônico da SBBq, 1., 2019, Manaus. **Anais [...]**. Manaus: 2019.

BEZERRA, J. L.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C.; CARVALHO, I. C. D. S.; PATRÍCIO, F. J.; SOUSA, S. M.; AMARAL, F. M. M.; MANUEL, J.; REBELO, M.; GUERRA, R. N. M.; NILCE, M.; RIBEIRO, S.; NASCIMENTO, F. R. F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.631–637, 2006.

BLANCO, M. M.; COSTA, C. A. R. A.; FREIRE, A. O.; SANTOS, J. G.; COSTA, M. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. **Phytomedicine**, v.16, p.265-270, 2009, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.04.007>

BORGES, H. B. N.; SILVEIRA, A. E.; VENDRAMIN, L. N. **Flora arbórea de mato grosso tipologias vegetais e suas espécies**. Cuiabá: Entrelinhas, 2014.

BOSE, S.; DU, Y.; TAKHISTOV, P.; MICHNIAK-KOHN, B. Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems. **International Journal of Pharmaceutics**, v.441, p.56–66, 2013, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.12.013>

BRAGA, K. R. R.; BARBIERI, R.; PINHEIRO, C. U. B. Composição florística das matas ciliares do alto curso do rio pericumã, baixada maranhense. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v.24, p.27–34, 2011.

BRASIL. ANVISA. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. 1 ed. Brasília: ANVISA, 2004.

BRASIL. **Distribuição da Leishmaniose Tegumentar**. 2024a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/situacao-epidemiologica#:~:text=Distribui%C3%A7%C3%A3o%20da%20Leishmaniose%20Tegumentar&text=Em%20m%C3%A9dia%2C%20s%C3%A3o%20registrados%20cerca,habitantes%20nos%20%C3%BAltimos%205%20anos>. Acesso em: 15 maio 2024.

BRASIL. **Distribuição da Leishmaniose Tegumentar**. 2024b. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/situacao-epidemiologica/arquivos/lt-casos.pdf>. Acesso em: 15 maio 2024.

BRASIL. **Leishmaniose Tegumentar**. 2024c. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt#:~:text=A%20Leishmaniose%20Tegumentar%20%C3%A9%20uma,\(Leishmania\)%20amazonensis%2C%20L](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt#:~:text=A%20Leishmaniose%20Tegumentar%20%C3%A9%20uma,(Leishmania)%20amazonensis%2C%20L). Acesso em: 15 maio 2024.

BRASIL. Ministro da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 37, de 1º de outubro de 2018**. Estabelece os parâmetros analíticos de suco e de polpa de frutas e a listagem das frutas e demais quesitos complementares aos padrões de identidade e qualidade já fixados. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=368178>. Acesso em: 02 abril 2024.

BRASTIANOS, H. C.; STURGEON, C. M.; ROBERGE, M.; ANDERSEN, R. J. Inhibition of the G2 DNA damage checkpoint by oliveroline isolated from *Duguetia odorata*. **Journal of Natural Products**, v.70, n.2, p.287–288, 2007. <https://doi.org/10.1021/np060285e>

BrCAST. Tabela de Pontos de Corte Clínicos do BrCAST - EUCAST. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, 2023.

BRUSTOLIN, A. Á.; RAMOS-MILARÉ, Á. C. F. H.; MELLO, T. F. P.; ARISTIDES, S. M. A.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V. In vitro activity of *cinnamaldehyde* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v.236–237, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108244>

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L. B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parental de fármacos. **Quim. Nova**, v.35, n.9, 2012.

CAMARA, M.; LIMA, A.; JUMBO, L.; TAVARES, C.; MENDONÇA, C.; MONTEIRO, O.; ARAÚJO, S.; DE OLIVEIRA, E.; NETO, J.; MAIA, J.; COSTA-JUNIOR, L.; DA ROCHA, C. Seasonal and Circadian Evaluation of the *Pectis brevipedunculata* Essential Oil and Its Acaricidal Activity against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 34, n.7, p.1020-1029, 2023. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20230017>

CARDOSO, M. N. A. **Atividade antimicrobiana do limoneno: estudo bibliométrico**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2021.

CASCAES, M. M.; DE MORAES, Â. A. B.; CRUZ, J. N.; FRANCO, C. DE J. P.; E SILVA, R. C.; NASCIMENTO, L. D.; FERREIRA, O. O.; ANJOS, T. O.; DE OLIVEIRA, M. S.;

GUILHON, G. M. S. P.; ANDRADE, E. H. DE A. Phytochemical Profile, Antioxidant Potential and Toxicity Evaluation of the Essential Oils from *Duguetia* and *Xylopia* Species (Annonaceae) from the Brazilian Amazon. **Antioxidants**, v.11, n.9, 2022, <https://doi.org/10.3390/antiox11091709>

CHADA, F. J. G. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de própolis em diferente maturação**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.

CHAUDHARY, S.; KUMAR, S.; KUMAR, V.; SHARMA, R. Chitosan nanoemulsions as advanced edible coatings for fruits and vegetables: Composition, fabrication and developments in last decade. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 154-170, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.276>.

CIRÍACO, S. L.; CARVALHO, I. P. S.; TERCEIRO NETO, J. A.; LIMA NETO, J. S.; DE OLIVEIRA, D. H. B.; CUNHA, A. P. G. P.; CAVALCANTE, Y. T. D.; DA SILVA, D. T. C.; DA SILVA, J. A.; MINEIRO, A. L. B. B.; DE LIMA, C. M. F.; CARVALHO, A. L. M. Development of microemulsion of tamsulosin and dutasteride for benign prostatic hyperplasia therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.185, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110573>

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 15 Informational Supplement. v.25, n.1, CLSI, Pennsylvania, 2005.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. 8 ed. v.25, n.1, NCCLS, Pennsylvania, 2003.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 30 ed. CLSI, Pennsylvania, 2020.

COLARES, A. V.; ALMEIDA-SOUZA, F.; TANIWAKI, N. N.; SOUZA, C. D. S. F.; DA COSTA, J. G. M.; CALABRESE, K. D. S.; ABREU-SILVA, A. L. In vitro antileishmanial activity of essential oil of *Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae) baker. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/727042>

CORRÊA, L. A. D.; DIAS, C.; RODRIGUES, A. A. C.; CANDIDO E SILVA, E. K.; DIAS, L. R. C.; MONTEIRO, O. S.; OLIVEIRA, L. J. M. G. Antifungal potential of essential oils from *Pectis brevipedunculata* and *Dizygostemon riparius* in anthracnose control in mango. **Rev. Bras. Frutic.**, v.45, 2023, <https://dx.doi.org/10.1590/0100-29452023889>

COSTA, D. F. N. **Potencial imunomodulador e antimicrobiano do (+)- α -pineno E (+)- β -pineno**. 2017. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

COSTA, E. V.; DE SOUZA, C. A. S.; GALVÃO, A. F. C.; SILVA, V. R.; SANTOS, L. D. S.; DIAS, R. B.; ROCHA, C. A. G.; SOARES, M. B. P.; DA SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F. *Duguetia pycnastera* Sandwith (Annonaceae) Leaf Essential Oil Inhibits HepG2 Cell Growth In Vitro and In Vivo. **Molecules**, v.27, n.37, 2022. doi: 10.3390/moléculas27175664.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, J. R. DE A.; MAIA, B. H. L. DE N. S.; DUARTE, M. C. T.; AMARAL, A. C. F.; MACHADO, G. M. DE C.; LEON, L. L.

Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). **Quim. Nova**, v.32, p.78–81, 2009.

COTTON, J. A. The Expanding World of Human Leishmaniasis Together. **Trends in Parasitology**, v.33, n.5, p. 339–341. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.01.001>

DONALD, L. P.; GARY, M. L.; GEORGE S. K.; JAMES R. V. **Introdução à espectroscopia**. 4 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

DO NASCIMENTO, J.R.; LIRA, B. S. M. M.; NASCIMENTO, M. O.; LOPES, G. L. N.; FERREIRA, G. M.; NUNES, G. C. S.; GONÇALVES, R. S.; CARVALHO, A. L. M.; VILEGAS, W.; DA ROCHA, C. Q. Microemulsão inovadora carregada com flavonóides diméricos incomuns de *Fridericia platyphylla* (Cham.) LG Lohmann Roots. **AAPS PharmSciTech**, v.24 , n.227, 2023. <https://doi.org/10.1208/s12249-023-02688->

DALLARMI, L.; MIGUEL, M.D.; CANSIAN, F.C. Desenvolvimento de emulsão dermatocósmética contendo manteiga de manga (*Mangifera indica* L.) Anacardiaceae. **Visão Acadêmica**, v.13, n.1, 2012.

DAMICO, F. M.; GASPARIN, F.; IOSHIMOTO, G. L.; IGAMI, T. Z.; CUNHA JR., A. S.; FIALHO, S. L.; LIBER, A. M.; YOUNG, L. H.; VENTURA, D. F. Intravitreal injection of polysorbate 80: a functional and morphological study. **Rev. Col. Bras. Cir.** v.44, n.6, 2017. <https://doi.org/10.1590/0100-69912017006010>

DURAN, M.; ADAY, M. S.; ZORBA, N. N. D.; TEMIZKAN, R.; BÜYÜKCAN, M. B.; CANER, C. Potential of antimicrobial active packaging ‘containing natamycin, nisin, pomegranate and grape seed extract in chitosan coating’ to extend shelf life of fresh strawberry. **Food and Bioproducts Processing**, v.98, 2016, p.354-363, <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.01.007>.

EDRIS, A. E.; MALONE, C. R. Formulation of banana aroma impact ester in water-based microemulsion nano-delivery system for flavoring applications using sucrose laurate surfactant. **Procedia Food Science**, v. 1, p.1821–1827, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.267>

EFSA. Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food. Scientific Opinion on the re-evaluation of polyoxyethylene sorbitan monolaurate (E 432), polyoxyethylene sorbitan monooleate (E 433), polyoxyethylene sorbitan monopalmitate (E 434), polyoxyethylene sorbitan monostearate (E 435) and polyoxyethylene sorbitan tristearate (E 436) as food additives. **EFSA Journal**, 2015; v.13, n.7, p.74, 2015. doi:10.2903/j.efsa.2015.4152.

FABROWSKI, F. J. *Eucalyptus smiñhii* R. T. Baker (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil. 2002. Tese (Doutrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

FARIAS, M. R. **Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais**. In Simões, C. M. O. Farmacognosia da planta ao medicamento. 6 ed. p. 1–1097. Florianópolis: Editora da UFRGS, 2007.

FDA – Food and Drugs Administration. **Food Additive Status List**. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/food-additive-status-list>. Acesso em: 14 maio 2024.

FDA/CFSAN – Food and Drugs Administration/ Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Approximate pH of Foods and Food Products**, 2008. Disponível em: <https://www.healthycanning.com/wp-content/uploads/pH-FDAApproximateHoffoodslacfpHs.pdf>. Acesso em: 02 abril 2024.

FENG, J. L.; WANG, Z. W.; ZHANG, J.; WANG, Z. N.; LIU, F. Study on food-grade vitamin E microemulsions based on nonionic emulsifiers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.339, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.01.002>

FERNANDES, C. N. **Avaliação dos efeitos antiulcerogênico e antibacteriano do extrato etanólico das folhas de *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) – Universidade Regional do Cariri, Crato, 2012.

FERREIRA, A. V. F. **Incorporation of Elastase Inhibitor in Silk Fibroin Nanoparticles for Transdermal Delivery**. 2013. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Universidade do Minho, Portugal, 2013.

FERREIRA, J. P.; ALVES, D.; NEVES, O.; SILVA, J.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P. C. Effects of the components of two antimicrobial emulsions on food-borne pathogens. **Food Control**, v.21, n.3, p.227–230, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.05.018>

FIGUEIREDO, K. A. **Obtenção tecnológica e avaliação in vivo de uma microemulsão contendo fenobarbital para uso transdérmico**. 2013. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2013.

FIGUEREDO, A. S. **Prospecção da ação leishmanicida de inibidores de proteases extraídas de *Bauhinia forficata* Link**. 2021. Dissertação (Mestrado em Saúde do Adulto) -Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

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

FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como Sistemas de Liberação para Fármacos Oftálmicos. **Acta Farm. Bonaerense**, v.23, n.4, p.558–566, 2004.

FU, X.; FENG, F.; HUANG, B. Physicochemical characterization and evaluation of a microemulsion system for antimicrobial activity of glycerol monolaurate. **International Journal of Pharmaceutics**, v.321, p.171–175, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.05.019>

FURLANETTO, S.; CIRRI, M.; PIEPEL, G.; MENNINI, N.; MURA, P. Mixture experiment methods in the development and optimization of microemulsion formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.55, n.4, p.610–617, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.01.008>

GATTEFOSSÉ. Transcutol® P. **For efficient drug solubilization and skin penetration**. França, 2020. Disponível em: <https://www.pharmaexcipients.com/wp-content/uploads/2020/07/Brochure-Transcutol-P-for-efficient-skin-penetration.pdf>. Acesso em: 15 maio 2024.

GBIF. *Duquetia stelechantha* (Diels) R. E. Fr. 2023a. Disponível em: <https://www.gbif.org/pt/species/3157541/metrics>.

GBIF. *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip. 2023b. Disponível em: <https://www.gbif.org/pt/species/5405460>. Acesso em: 10 janeiro 2023.

GORANTLA, S.; WADHWA, G.; JAIN, S.; SANKAR, S.; NUWAL, K.; MAHMOOD, A.; DUBEY, S.K.; TALIAN, R.; KESHARWANI, P.; SINGHVI, G. Recent advances in nanocarriers for nutrient delivery. **Drug Deliv Transl Res.** v.12, n.10, p.2359-2384, 2022. doi: 10.1007/s13346-021-01097-z. Epub 2021

GUERREIRO, A. C.; GAGO, C. M. L.; FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G.C.; ANTUNES, M. D.C. The use of polysaccharide-based edible coatings enriched with essential oils to improve shelf-life of strawberries. **Postharvest Biology and Technology**, v.110, p.51-60, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.06.019>.

GUIMARÃES, D.R.; SOUSA, T.F.; ANGOLINI, C.F.F.; SOUZA, A.D.L.; SILVA, F.M.A.; SOUZA, A.Q.L.; SILVA, G.F.; KOOLEN, H.H.F. **Produção de pigmentos do tipo azafilonas por *Penicillium sclerotiorum***. In: OLIVEIRA, L.A.; OLIVEIRA, J.G.S.; GASPAROTTO, L.; JESUS, M.A.; ROCHA, L.C.; BENTES, J.L.S.; KIRSCH, L.S.; ANDRADE, S.L. Diversidade Microbiana da Amazônia. v. 3, Manaus: Editora INPA, 2019.

GUPTA, A.; ERAL, H. B.; HATTON, T. A.; DOYLE, P. S. Nanoemulsions: Formation, properties and applications. **Soft Matter**, v. 12, n.11, p. 2826-2841, 2016. <https://doi.org/10.1039/c5sm02958a>

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. **Medical Mycolo Gy**, v.38, p.355–362, 2000. <https://doi.org/10.1080/mmy.38.5.354.361>

HEEP, G. L. **Caracterização dos óleos essenciais de folhas e flores de *Senecio brasiliensis* (SPRENG.) LESS.** 2007. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

HELLMANN, M. A.; MARCHESAN, E. D.; VELASQUEZ, L. G. Leishmaniose e plantas medicinais: uma revisão. **Arquivos de Ciências Da Saúde Da UNIPAR**, v.22, n.3, 2018. <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v22i3.2018.6921>

HORISON, R.; SULAIMAN, F.O.; ALFREDO, D.; WARDANA, A. A. Physical characteristics of nanoemulsion from chitosan/nutmeg seed oil and evaluation of its coating against microbial growth on strawberry. **Food Research**, v.3, n.6, p.821 – 827, 2019. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.3\(6\).159](https://doi.org/10.26656/fr.2017.3(6).159)

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 4 ed. v. 4. p.1020. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JÜRGENS, A.; WEBBER, A. C.; GOTTSBERGER, G. Floral scent compounds of Amazonian Annonaceae species pollinated by small beetles and thrips. **Phytochemistry**, v.55, p.551–558, 2000.

KHAN, I.; TANGO, C. N.; CHELLIAH, R.; OH, D. H. Development of antimicrobial edible coating based on modified chitosan for the improvement of strawberries shelf life. **Food Science and Biotechnology**, v.28, n.4, p.1257–1264, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-00554-9>

KOOLEN, H. H. F.; MENEZES, L. S.; SOUZA, M. P.; SILVA, F. M. A.; ALMEIDA, F. G. O.; DE SOUZA, A. Q. L.; NEPEL, A.; BARISON, A.; DA SILVA, F. H.; EVANGELISTA, D. E.; DE SOUZA, A. D. L. Talaroxanthone, a novel xanthone dimer from the endophytic fungus *talaromyces* sp. associated with *Duquetia stelechantha* (diels) R. E. Fries. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.24, n.5, p.880–883, 2013. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130104>

KÜLKAMP, I. C.; PAESE, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Quim. Nova**, v.32, n.8, 2009.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Análise de Viabilidade Celular pelo Ensaio MTT. **Cold Spring Harb Protoc**, v.6, 2018.

Larone, D. H.; Walsh, T. J.; Hayden, R. T. **Larone's Medically Important Fungi: A Guide to Identification**. 6 ed. : Washington: ASM Press, 2018.

LEAL, R. H. **Prospecção de plantas aromáticas na região do médio e baixo Solimões**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

LEITE, M. F. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo extrato e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* para enxaguatório bucal**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

LIAS, S. G.; MIKAIA, A. I.; SPARKMAN, O. D.; STEIN, S. E.; ZAIKIN, G. **The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database: Simultaneous Control of Quality and Quantity**. In Proceedings of the 45th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics. 2022. Disponível em: <https://www.nist.gov/publications/nistepanlh-mass-spectral-databasesimultaneous-control-quality-and-quantity>. Acesso em: 5 agosto 2023.

LIMA, A. DA S.; MACIEL, A. P.; MENDONÇA, C. DE J. S.; COSTA JUNIOR, L. M. Use of encapsulated carvacrol with yeast cell walls to control resistant strains of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Industrial Crops and Products**, v.108, p.190–194, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.037>

LIMA, A. S.; FERNANDES, Y. M. L.; SILVA, C. R.; COSTA-JUNIOR, L. M.; FIGUEIREDO, P. L. B.; MONTEIRO, O. S.; MAIA, J. G. S.; DA ROCHA, C. Q. Anthelmintic evaluation and essential oils composition of *Hyptis dilatata* Benth. and *Mesosphaerum suaveolens* Kuntze from the Brazilian Amazon. **Acta Tropica**, v.228, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106321>

LOBÃO, A. Q.; BAZANTE, M. L. ***Duquetia* in Flora e Funga do Brasil**. 2023. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB110353>. Acesso em: 2 Jan 2021.

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

LORENZI, H.; MATOS, F. J. DE A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LU, W. C.; HUANG, D. W.; WANG, C. C. R.; YEH, C. H.; TSAI, J. C.; HUANG, Y. T.; LI, P. H. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.26, n.1, p.82–89, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.018>

LYRA, L. P. S. **Desenvolvimento de Nanoemulsão de geraniol e óleo essencial da palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e sua ação inibitória sobre linhagens de *Cutibacterium acnes***. 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho.”, São Paulo, 2019.

MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y. TH.; CHATROU, A. L. W. **Duguetia (Annonaceae)**. New York: Organization for Flora Neotropica by the New York Botanical Garden, 2003. p.274.

MACHADO, O. V. O.; PATROCÍNIO, M. C. A.; MEDEIROS, M. S.; GOMES, T. DE J. P. **Antimicrobianos: revisão geral para graduandos e generalistas**. EdUnichristus, 2019.

MAGALHÃES, K. DO N.; BANDEIRA, M. A. M.; MONTEIROS, M. P. **Plantas medicinais da caatinga do Nordeste brasileiro Etnofarmacopeia do Professor**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2020.

MAIA, D. S.; LOPES, C. F.; SALDANHA, A. A.; SILVA, N. L.; SARTORI, Â. L. B.; CAROLLO, C. A.; SOBRAL, M. G.; ALVES, S. N.; SILVA, D. B.; SIQUEIRA, J. M. Larvicidal effect from different Annonaceae species on *Culex quinquefasciatus*. **Environmental Science and Pollution Research**, v.27, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08997-6>/Published

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; CARREIRA, L. M. M.; OLIVEIRA, J. Essential oil composition from duguetia species (annonaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v.18, n.1, p.60–63, 2006. <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699386>

MARINO, C. J. M. **Desenvolvimento e controle de qualidade de formulações emulsionadas contendo óleo de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**. 2018. Trabalho de Conclusão Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop, 2018.

MARQUES, A. M.; KAPLAN, M. A. C. Preparative isolation and characterization of monoterpenes isomers present in the citral-rich essential oil of *Pectis brevipedunculata*. **Journal of Essential Oil Research**, v.25, n.3, p.210–215, 2013. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.767756>

MARQUES, A. M.; LIMA, C. H. P.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; ESTEVES, R. L.; KAPLAN, M. A. C. Traditional use, chemical composition and antimicrobial activity of *Pectis brevipedunculata* essential oil: A correlated lemongrass species in Brazil. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v.25, n.10, p.798–808, 2013. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v25i10.16408>

MARQUES, A. M.; TRINDADE, A. P. F.; GARCIA, A. T. C.; ARAUJO FILHO, H. C.; ESTEVES, R. L.; KAPLAN, M. A. C. Comparação do óleo essencial de três espécimens de

Pectis brevipedunculata (Gardner) Sch. Bip. In: 58ª Reunião Anual da SBPC, 58., 2006, Florianópolis. **Anais [...]**. Florianópolis: 2006.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v.8, n.6, p.1719–1729, 2012. <https://doi.org/10.1039/c2sm06903b>

MELO, N. F. C. B.; SOARES, B. L. DE M.; DINIZ, K. M.; LEAL, C. F.; CANTO, D.; FLORES, M. A. P.; TAVARES-FILHO, J. H. DA C.; GALEMBECK, A.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD-ARNAUD, T. M.; STAMFORD, T. C. M. Effects of fungal chitosan nanoparticles as eco-friendly edible coatings on the quality of postharvest table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v.139, p.56–66, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.01.014>

MENDES, R. DE F.; PINTO, N. DE C. C.; DA SILVA, J. M.; DA SILVA, J. B.; HERMISDORF, R. C. DOS S.; FABRI, R. L.; CHEDIER, L. M.; SCIO, E. The essential oil from the fruits of the Brazilian spice *Xylopiia sericea* A. St.-Hil. presents expressive in-vitro antibacterial and antioxidant activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.69, n.3, p.341–348, 2017. <https://doi.org/10.1111/jphp.12698>

MENDONÇA, C. B. F.; ESTEVES, V. G.; ESTEVES, R. L. Palinologia de espécies de Asteroideae (Compositae) ocorrentes na restinga de Carapebus, Rio de Janeiro. **Hoehnea**, v.29, n.3, p.233–240, 2002.

MENEGUETTI, D. U. DE O.; LIMA, R. A.; MACEDO, S. R. A.; BARROS, N. B.; FACUNDO, J. B.; MILITÃO, J. S. L. T.; NICOLETE, R.; FACUNDO, V. A. Atualização plantas da amazônia brasileira com potencial leishmanicida *in vitro*. **Rev Patol Trop**, v.44, n.4, p.359–374, 2015.

MENEZES, J. P. B.; GUEDES, C. E. S.; PETERSEN, A. L. D. O. A.; FRAGA, D. B. M.; VERAS, P. S. T. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed research international**. 2015, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/815023>

MERCIER, B.; PROST, J.; PROST, M. The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α - and β -pinenes): A review. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v.22, n.4, p.331–342, 2009. <https://doi.org/10.2478/v10001-009-0032-5>

MONDELLO, L.; Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds: Mass Spectral Database, 2nd ed.; **John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA**, 2011.

MORAES JÚNIOR, R. C. **Desenvolvimento, caracterização e estudo de estabilidade de microemulsões para veiculação de fragrâncias**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociência) - Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2015.

MORAIS, R. C. S. **Aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real para caracterização de espécies de Leishmania**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

MOREIRA, F. V.; BASTOS, J. F. A.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; SANTOS, M. R. V. Chemical composition and cardiovascular effects induced by the essential oil of *Cymbopogon citratus* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.6, p.904–909, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000012>

MOTA, E. F.; ROSARIO, D. M.; VEIGA, A. S. S.; BRASIL, D. D. S. B.; SILVEIRA, F. T.; DOLABELA, M. F. Biological activities of *Croton palanostigma* Klotzsch. **Pharmacognosy Magazine**, v.12, n.45, p.96–101, 2016. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.176109>

MÜLLER, W. A.; SILVA, P. R. S. Modeling and simulation of *Talaromyces flavus* growth in pineapple: an integration between kinetic and transport phenomena models. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.22, 2019. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.29218>

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

NASCIMENTO, V. S. A. **Sistemas microemulsionados contendo óleo essencial de *Lippia gracilis*: Obtenção, Caracterização e Potencial Ação Amebicida**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, 2016.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v.6, n.12, p. 1451–1474, 2013. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>

NETO, R. N. M.; SETÚBAL, R. F. B.; HIGINO, T. M. M. I.; BRELAZ-DE-CASTRO; M. C. A., DA SILVA, L. C. N.; DOS SANTOS ALIANÇA, A. S. Asteraceae plants as sources of compounds against leishmaniasis and chagas disease. **Frontiers in Pharmacology**, p.1–20, 2019. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00477>

NEVES, J. K. O. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões antimicrobianas e anti-inflamatórias contendo óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

NGOUONPE, A. W.; MBOBDA, A. S. W.; HAPPI, G. M.; MBIANTCHA, M.; TATUEDOM, O. K.; ALI, M. S.; LATEEF, M.; TCHOUANKEU, J. C.; KOUAM, S. F. Natural products from the medicinal plant *Duguetia staudtii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.83, p.22–25, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.12.015>

NOGUEIRA, J. O. **Ação antimicrobiana de diferentes terpenos e fenilpropanoides em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***. 2019. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

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

OLIVEIRA, M. T. R. DE; BERBERT, P. A.; ROBERTO, C.; MATOS, R.; MATHIAS, L.; OLIVEIRA MOREIRA, R. Efeito da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Pectis brevipedunculata*. **Quim. Nova**, v.34, n.7, p.1200–1204, 2011.

OLIVEIRA, M.T.R.; BERBERT, P.A.; MARTINAZZO, A.P. Avaliação de modelos matemáticos na descrição das curvas de secagem por convecção de *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch. Bip. **Rev. bras. plantas med.** v.15, n.1, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000100001>

OLIVEIRA, R. P. R. F. **Desenvolvimento de nanoemulsões contendo flavonoides de *Ocotea notata* (Nees) Mez e avaliação de atividades biológicas**. 2014a. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2014a.

OLIVEIRA, E. C. V. **Desenvolvimento de nanoemulsões contendo ácido ursólico para otimização do tratamento da doença de Chagas**. 2014b. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014b.

Oliveira, J. D.; Alves, C. C. F.; Miranda, M. L. D.; Martins, C. H. G.; Silva, T. S.; Ambrosio, M. A. L. V.; Alves, J. M.; Silva, J. P. Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n.2, p.502–510, 2016. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_206

Sousa, O. V.; Glauciemar, D. V. V.; Santos, B. C. S.; lia, H. Y. C.; Ana, U. S. A.; Ailson, L. A. A.; Miriam, Aparecida, A. O. P.; Rodarte, M. P.; Alves, M. S. In-vivo and vitro bioactivities of the essential oil of *Duguetia lanceolata* branches. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.10, n.14, p.298–310, 2016. <https://doi.org/10.5897/ajpp2015.4497>

PAHO - Pan American Health Organization. **Guideline for the treatment of leishmaniasis in the Americas**. 2 ed. Washington, DC: PAHO; 2022. <https://doi.org/10.37774/9789275125038>.

PATHAKOTI, K.; MANUBOLU, M.; HWANG, H. Nanostructures: Current uses and future applications in food Science. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.25, n.2, p. 245-253, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.02.004>.

PEREIRA, S.L.; MARQUES, A.M.; SUDO, R.T.; KAPLAN, M.A.; ZAPATA-SUDO, G. Vasodilator activity of the essential oil from aerial parts of *Pectis brevipedunculata* and its main constituent citral in rat aorta. **Molecules**. v.7, n.18, 2013, doi:10.3390/molecules18033072.

PIRES, E. A. M. **Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para a avaliação da qualidade de matérias-primas e microemulsões com atividade leishmanicida**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

PONTE-SUCRE, A.; GAMARRO, F.; DUJARDIN, J. C.; BARRETT, M. P.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, R.; POUNTAIN, A. W.; MWENECHANYA, R.; PAPADOPOULOU, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.11, n.12, p.1–24, 2017, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>

RAPOSO, J. D. A.; FIGUEIREDO, P. L. B.; SANTANA, R. L.; DA SILVA JR., A. Q.; SUEMITSU, C.; DA SILVA, R.; MOURÃO, R. H. V.; MAIA, J. G. S.; **Biochem. Syst. Ecol.** 2018, 79, 21.

RABELO, D. DE M.; SILVA, J. R. A.; AMARAL, A. C. F.; BIZZO, H. R.; BEZERRA, J. DE A.; CORRÊA, R. F.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINHEIRO, M. L. Atividade Leishmanicida, Composição e Citotoxicidade do Óleo Essencial das folhas de *Guatteria citriodora* Ducke (Annonaceae). In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 31., 2008, Águas de Lindóia. **Anais [...]**. Águas de Lindóia: 2008.

RAMOS, M.; MELLINAS, C.; SOLABERRIETA, I.; GARRIGÓS, M.C.; JIMÉNEZ, A. Emulsions Incorporated in Polysaccharide-Based Active Coatings for Fresh and Minimally Processed Vegetables. **Foods**, v.10, 2021, <https://doi.org/10.3390/foods10030665>

REIS, A. S.; RIOS, C. E. P.; MELO, L. P.; COSTA, G. C.; SILVA, L. A.; PATRÍCIO, F. J. B.; AMARAL, F. M. M.; NASCIMENTO, F. R. F. Atividade leishmanicida *in vitro* de frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. **Rev. Ciênc. Saúde**, v.14, n.2, p.119–126, 2012.

REIS, M. Y. F. A. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsão com óleo de babaçu (*Orbignya phalerata*) para uso tópico**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

RIBEIRO, J. E. L. DA S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. DA S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. DA C.; SILVA, C. F. DA; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA, 1999.

RIBEIRO, L. P.; DOMINGUES, V. C.; GONÇALVES, G. L. P.; FERNANDES, J. B.; GLÓRIA, E. M.; VENDRAMIM, J. D. Essential oil from *Duguetia lanceolata* St.-Hil. (Annonaceae): Suppression of spoilers of stored-grain. **Food Bioscience**, v.36, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100653>

RODRIGUES, A. C. B. C.; BOMFIM, L. M.; NEVES, S. P.; MENEZES, L. R. A.; DIAS, R. B.; SOARES, M. B. P.; PRATA, A. P. N.; ROCHA, C. A. G.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Antitumor Properties of the Essential Oil from the Leaves of *Duguetia gardneriana*. **Planta Medica**, v.81, n.10, p.798–803, 2015. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1546130>

RODRIGUES, D. G.; SILVA, N. B. M.; REZENDE, C.; JACOBUCCHI, H. B.; FONTANA, E. A. Avaliação de dois métodos de higienização alimentar. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 3, p. 341-350, 2011.

ROMANELLI, M. F. **Avaliação da toxicidade aguda e crônica dos surfactantes dss e las submetidos à irradiação com feixes de elétrons**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ROSETTI, M. K. D. P. **Toxicidade de óleos essenciais de anonáceas para *Spodoptera frugiperda* (SMITH, 1797) (lepidoptera: noctuidae) e seletividade para *Trichogramma pretiosum* RILEY, 1879 (hymenoptera: trichogrammatidae)**. 2021. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais e Sustentabilidade) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, 2021

Royal Botanic Gardens, Kew. ***Duguetia stelechantha***. 2023. Disponível em: [Http://Powo.Science.Kew.Org/Taxon/Urn:Lsid:Ipni.Org:Names:60474507-2#image-Gallery](http://Powo.Science.Kew.Org/Taxon/Urn:Lsid:Ipni.Org:Names:60474507-2#image-Gallery). <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:60474507-2#image-gallery>. Acesso em: 8 Mar 2023.

RUFINO, M. DO S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. DE; MORAIS, S. M. DE; SAMPAIO, C. DE G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS +**. Comunicado Técnico 128. Fortaleza: Embrapa, 2007a.

RUFINO, M. DO S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. DE; MORAIS, S. M. DE; SAMPAIO, C. DE G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Comunicado Técnico 127. Fortaleza: Embrapa, 2007b.

SAKYI, P. O.; AMEWU, R. K.; DEVINE, R. N. O. A.; ISMAILA, E.; MILLER, W. A.; KWOFIE, S. K. The Search for Putative Hits in Combating Leishmaniasis: The Contributions of Natural Products Over the Last Decade. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 11, n. 5, p. 489–544, 2021, <https://doi.org/10.1007/s13659-021-00311-2>

SALGADO, V. G.; GUTIÉRREZ, D. G. **Pectis in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2023. Disponível em: <https://Floradobrasil.Jbrj.Gov.Br/FB16235>. <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB16235>. Acesso em: 5 Fev 2023.

SANTANA, R. C.; FASOLIN, L. H.; DA CUNHA, R. L. Effects of a cosurfactant on the shear-dependent structures of systems composed of biocompatible ingredients. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.398, p. 54-63, 2012, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.02.009>.

SANTIAGO, J. A.; CARDOSO, M. D. G.; BATISTA, L. R.; CASTRO, E. M. DE; TEIXEIRA, M. L.; PIRES, M. F. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L.: secretory structures, antibacterial and antioxidant activities. **Acta Scientiarum**, v.38, n.2, 2016, <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v38i2.28303>

SANTOS, A. C.; NOGUEIRA, M. L.; OLIVEIRA, F. P.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Essential Oils of *Duguetia* Species A. St. Hill (Annonaceae): Chemical Diversity and Pharmacological Potential. **Biomolecules**, v. 12, n.5, 2022, <https://doi.org/10.3390/biom12050615>

SANTOS, P. R. R.; LEÃO, U. E.; AGUIAR, R. W. S.; MELO, M. P.; SANTOS, G. R. Caracterização morfológica e molecular de *Curvularia lunata* patogênica ao capim andropogon. **Bragantia**, v. 77, n. 2, 2018, <https://doi.org/10.1590/1678-4499.2017258>

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: fundamentos teóricos e práticos**. São Paulo: Artliber, 2006.

SIBBr. *Duguetia stelechantha* in **Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira** (SiBBr). 2023. Disponível em: https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/duguetia_stelechantha Acesso em: 6 Fev 2023.

SIENIAWSKA, E.; ŚWIĄTEK, L.; WOTA, M.; RAJTAR, B.; POLZ-DACEWICZ, M. Microemulsions of essentials oils – Increase of solubility and antioxidant activity or cytotoxicity? **Food and Chemical Toxicology**, v. 129, p. 115-124, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.038>.

SILVA, C. E. L.; OYAMA, J.; FERREIRA, F. B. P.; SILVA, M. P. P.; LORDANI, T. V. A.; SILVA, R. C. L.; MONICH, M. S. T.; TEIXEIRA, J. J. V.; LONARDONI, M. V. C. Effect of essential oils on *Leishmania amazonensis*: A systematic review. **Parasitology**, v.147, n.13, p. 1392–1407, 2020, <https://doi.org/10.1017/S0031182020001304>

SILVA, D. B.; SIQUEIRA, J. M. DE; TULLI, E. C. D. O.; GRASSI, R. F.; FABRI, J. R.; NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L. DE; CHANG, R. Constituintes apolares de *Duguetia furfuracea*. In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 28., 2005, Poços de Caldas. **Anais** [...].Poços de Caldas: 2005.

SILVA, D. B. DA; TULLI, E. C. O.; GARCEZ, W. S.; NASCIMENTO, E. A.; SIQUEIRA, J. M. DE. Chemical constituents of the underground stem bark of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, n.8, p.1560–1565, 2007, <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000800017>

SILVA, G. R.; NASCIMENTO, L. DA S.; MELO, J. A. DE; NASCIMENTO, F. DAS C. DO. Identificação dos constituintes químicos e ensaio biológico do óleo essencial de *Pectis elongata* Kunth (Asteraceae). **Revista de Ciência e Tecnologia**, v.7, 2021.

SILVA, J. A.; BEDOR, R. D. C. G. L.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T.; SANTANA, D. P. Physicochemical characterization and desenvolvimento of a microemulsion system for transdermal use. **J. Dispersion Sci. Technol.**, v.30, 2009.

SILVA, J. A.; DASMACHENO, B. P. G. L.; BORBA, V. F. C.; EGITO, E. S. T.; SANTANA, D. P. Uso de diagramas de fase pseudoternários como ferramenta de obtenção de nanoemulsões transdérmicas. **Rer. Bras. Far.**, v.90, p.245–249, 2009.

SILVA, J. A.; SANTANA, D. P.; GALINDO, D.; BEDOR, C.; BORBA, F. C.; AMÉLIA, A.; LIRA, M. Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Quim. Nova**, v. 32, n.6, 2009.

SILVA, J. D. F.; SILVA, Y. P.; PIATNICKI, C. M. S.; BÖCKEL, W. J.; MENDONÇA, C. R. B. Microemulsões: Componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. **Química Nova**, v.38, n.9, p.1196–1206, 2015, <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150135>

SILVA-SILVA, J. V. **Estudos farmacognósticos, fitoquímicos e atividade antileishmania de espécies *Geissospermum* (Apocynaceae)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

SILVEIRA, A. C.; KASSUIA, Y. S.; DOMAHOVSKI, R. C.; LAZZAROTTO, M. **Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível**. Comunicado Técnico 421. Colombo: Embrapa, 2018.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos Voláteis**. In Farmacognosia da planta ao medicamento. 6 ed., pp. 1–1097, Florianópolis: Editora da UFRGS, 2007.

SINGLA, M.; PATANJALI, P. K. Phase behaviour of neem oil based microemulsion formulations. **Industrial Crops and Products**, v.44, p.421–426, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.016>

SIQUEIRA, J. M.; MÜLLER, L.; CAROLLO, C. A.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D.; NASCIMENTO, E. A. Aromadendrane sesquiterpenoids from the essential oil of leaves of *Duguetia glabriuscula* - Annonaceae. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 48, n.4, 2003. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072003000400014>

SOBRINHO, A. C. N. **Composição química, potencial antifúngico e antioxidante dos óleos essenciais de *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers., *Eupatorium ballotifolium* Kunth e *Vernonia chalybaea* Mart. ex DC. (asteraceae).** 2016. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Recursos Naturais) - Universidade Estadual Do Ceará, Fortaleza, 2016.

SOUSA, O. V.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; ALVES, M. S.; ARAÚJO, A. A. L.; PINTO, M. A. O.; AMARAL, M. P. H.; RODARTE, M. P.; KAPLAN, M. A. C. Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Duguetia lanceolata* St. Hil. barks. **Molecules**, v.17, n.9, p.11056–11066, 2012. <https://doi.org/10.3390/molecules170911056>

SOUZA, M. P. Estudo químico de fungos endofíticos associados a *Duguetia stelechantha* e *Rollinia* sp. 2012. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

SPERNATH, A.; YAGHMUR, A.; ASERIN, A.; HOFFMAN, R. E.; GARTI, N. Food-grade microemulsions based on nonionic emulsifiers: Media to enhance lycopene solubilization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.23, p.6917–6922, 2002. <https://doi.org/10.1021/jf025762n>

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária**, 6 ed., Barueri: Editora Manole, 2017.

TACO - Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP- 4. ed. Campinas: NEPA- UNICAMP, 2011. 161 p.

TAO, N.; LEI JIA, Q. O. Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism. **Food Control**, v.41, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.010>

TARTARO, G.; MATEOS, H.; SCHIRONE, D.; ANGELICO, R.; PALAZZO, G. Microemulsion microstructure(s): A tutorial review. **Nanomaterials**, v.10, n.9, p. 1–40, 2020, <https://doi.org/10.3390/nano10091657>

TEIXEIRA, E. R. F. **Veiculação de óleo de *Syzygium aromaticum* L. em sistema microemulsionado e suas derivatizações: avaliação das suas propriedades antioxidante, analgésica e viabilidade celular.** 2017. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

TELES, A. M.; SILVA-SILVA, J. V.; FERNANDES, J. M. P.; ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, K. D. S.; MENDES FILHO, N. E.; MOUCHREK, A. N.; ALMEIDA-SOUZA, F. GC-MS Characterization of Antibacterial, Antioxidant, and Antitrypanosomal Activity of *Syzygium aromaticum* Essential Oil and Eugenol. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6663255>

TEMPONE, A. G.; BORBOREMA, S. E. T.; ANDRADE, H. F.; GUALDA, N. C. A.; YOGI, Á.; CARVALHO, C. S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; FISCHER, D. C. H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v.12, n.5, p.382–390, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.10.007>

TOSCAN, C. M. **Atividade Antimicrobiana e Antioxidante de Terpenoides**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias Do Sul, Caxias Do Sul 2010.

TOURNAS, V.H.; KATSOUDAS, E. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, p.11-17, 2005, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.002

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6 ed. São Paulo: Atheneu, 2015.

TRINDADE, A. P. F.; GARCIA, A. T. C.; MARQUES, A. M.; ARAÚJO FILHO, H. C.; LIMA, M. C. H. P.; ESTEVES, R. L.; KAPLAN, M. A. C. Análise do óleo essencial de *Pectis brevipedunculata* (GARDNER) SCH. BIP. (Asteraceae). In: 57ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 57., 2005, Fortaleza. **Anais [...]**.Fortaleza: 2005.

ÜSTÜNDAĞ OKUR, N.; APAYDIN, Ş.; KARABAY YAVAŞOĞLU, N. Ü.; YAVAŞOĞLU, A.; KARASULU, H. Y. Evaluation of skin permeation and anti-inflammatory and analgesic effects of new naproxen microemulsion formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v.416, n.1, p.136–144, 2011, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.06.026>

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v.1, p.463-471, 1963, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)

VÁSQUEZ, S. P. F.; DE MENDONÇA, M. S.; NODA, S. DO N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v.44, n.4, p.457–472, 2014, <https://doi.org/10.1590/1809-4392201400423>

VIDOTTO, C.; SILVA, D. B.; PATUSSI, R.; BRANDÃO, L. F. G.; TIBÚRCIO, J. D.; ALVES, S. N.; SIQUEIRA, J. M. Brine shrimp lethality test as a biological model for preliminary selection of pediculicidal components from natural source. **Original Article Biosci.** p.255–263, 2013.

WHO. **Leishmaniasis**. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 9 abril 2023.

WINSOR, P. A. Hydrotropy, Solubilisation and Related Emulsification Processes. **Trans. Faraday Soc.**, v.44, p.376–398, 1948.

YANG, Y. N.; LIANG, M.; YANG, Y.; ZHENG, F. P.; WANG, X. P.; YU, A. N. Optimization of a headspace solid-phase microextraction method for the gas chromatography-mass spectrometry analysis aroma compounds of litsea mollis hemsl. Immature fruit. **Food Science and Technology**, v.40, n.4, p.786–793, 2020, <https://doi.org/10.1590/fst.20319>

ZHANG, H.; CUI, Y.; ZHU, S.; FENG, F.; ZHENG, X. Characterization and antimicrobial activity of a pharmaceutical microemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v.395, p.154–160, 2010, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.05.022>

ZHANG, H.; SHEN, Y.; BAO, Y.; HE, Y.; FENG, F.; ZHENG, X. Characterization and synergistic antimicrobial activities of food-grade dilution-stable microemulsions against

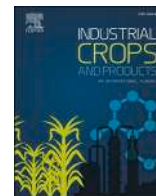
Bacillus subtilis. **Food Research International**, v.41, n.5, v.495–499, 2008, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.02.006>

ZIANI, K.; FANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication and stability of colloidal delivery systems for flavor oils: Effect of composition and storage conditions. **Food Research International**, v.46, n.1, p.209–216, 2012, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.017>

ZIDORN, C. Plant chemophenetics – A new term for plant chemosystematics/plant chemotaxonomy in the macro-molecular era. **Phytochemistry**, v.163, p. 147–148, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.02.013>.

ANEXOS

Anexo A - Barata Lopes, Auxiliadora C.C.; Camara, Marcos B.P.; Lima, Aldilene S.; Nascimento, Matheus Oliveira; Xavier, Júlia Karla A. M.; Jesus, Caroline M.; Mendonça, Cáritas J.S.; Carvalho, André Luis M.; Silva, Lucilene A.; **Cláudia Q. da Rocha.** Chemical composition and potential antileishmanial and cytotoxic activity of *Duguetia stelechantha* (Diels) R.E.Fr. essential oil. **Industrial Crops and Products**, volume 202, 2023, 116978, ISSN 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116978>.



Chemical composition and potential antileishmanial and cytotoxic activity of *Duguetia stelechantha* (Diels) R.E.Fr. essential oil

Auxiliadora C.C. Barata Lopes^a, Marcos B.P. Camara^a, Aldilene S. Lima^b,
Matheus Oliveira do Nascimento^c, Júlia Karla A. M. Xavier^b, Caroline M. de Jesus^d,
Cáritas J.S. Mendonça^b, André Luis M. Carvalho^c, Lucilene A. Silva^e, Cláudia Q. da Rocha^{a,b,*,1}

^a Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), Universidade Federal do Maranhão, 65080-805 São Luís, MA, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Maranhão, 65080-805 São Luís, MA, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550 Teresina, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão, 65900-410 Imperatriz, MA, Brazil

^e Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, 65080-805 São Luís, MA, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Annonaceae
Ata brava
Formulation
L. (L.) amazonensis
Monoterpenes
RAW 264.7

ABSTRACT

Duguetia stelechantha (Diels) R.E.Fr., popularly known as “ata brava” in Brazil, belongs to the Annonaceae family. Biologically active monoterpenes and sesquiterpenes identified in this genus and family, comprising a source of new drugs against several conditions, including leishmaniasis. In this context, the aim of the present study was to extract and chemically characterize the essential oil (EO-DU) obtained from *D. stelechantha* for the first time. The potential antileishmanial activity and in vitro cytotoxicity of an EO microemulsion (EO-ME) formulated with Tween 80 and Transcutol P surfactants were also evaluated. *Duguetia stelechantha* leaves were submitted to a hydrodistillation process and their chemical composition was determined by GC/MS. The major identified EO components were β -pinene (46.17 %), α -pinene (20.2 %), and spathulenol (6.68 %). A headspace characterization indicated major EO-DU compounds present in the prepared ME, confirming incorporation. The extracted EO was moderately active against *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes ($IC_{50} = 138.3 \mu\text{g/mL}$), while the EO-ME was determined as active, inhibiting these parasites at a lower concentration ($IC_{50} = 4.47 \mu\text{g/mL}$) compared to the EO-DU, indicating high selectivity against *L. (L.) amazonensis* promastigotes. The major compound α -pinene was also tested, and presented $IC_{50} = 64.78 \mu\text{g/mL}$, considering it active against the tested parasites. Considering that *D. stelechantha* is an abundant species in the Brazilian Legal Amazon and that the antileishmanial potential of the extracted EO was enhanced by EM incorporation, this assessment provides relevant perspectives for future studies focused on the bioeconomy.

1. Introduction

Leishmaniasis affects 1 million of people worldwide every year (Jesus et al., 2021; WHO, 2023). American tegumentary leishmaniasis is a non-contagious infectious disease transmitted to humans through the bite of sandfly females (*Phlebotomus* and *Lutzomyia* genus) infected by protozoa belonging to the *Leishmania* genus. *Leishmania amazonensis* is

associated with American tegumentary leishmaniasis, causing skin and mucous membrane ulcers in humans (Lima et al., 2020).

The current arsenal used to treatment leishmaniasis comprises pentavalent antimonials, amphotericin B and its liposomal formulation AmBisome, miltefosine, paromomycin, and pentamidine. However, high toxicity to humans and cases of parasite resistance have led to limitations regarding these therapeutic resources (Neto et al., 2019;

* Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), Universidade Federal do Maranhão, 65080-805 São Luís, MA, Brazil.

E-mail addresses: auxiliadora.lopes@discente.ufma.br (A.C.C. Barata Lopes), marcos.camara@discente.ufma.br (M.B.P. Camara), aldilene@hotmial.com (A.S. Lima), matheusodn@hotmail.com (M.O. do Nascimento), julia.xavier@icen.ufpa.br (J.K.A. M. Xavier), caroline.mj@discente.ufma.br (C.M. de Jesus), caritasflordelotus@gmail.com (C.J.S. Mendonça), aluismeneses@ufpi.edu.br (A.L.M. Carvalho), lucilene.silva@ufma.br (L.A. Silva), rocha.claudia@ufma.br (C.Q. da Rocha).

¹ ORCID: 0000-0002-3578-1869.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116978>

Received 6 April 2023; Received in revised form 29 May 2023; Accepted 1 June 2023

Available online 9 June 2023

0926-6690/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

Ponte-Sucre et al., 2017), resulting in an urgent search for effective control methods. In this regard, aromatic compounds and terpenes are excellent candidates for antileishmanial drug production. Furthermore, the effects of these compounds can be enhanced when incorporated into certain formulations, such as microemulsions (ME), which are thermodynamically stable and increase the bioavailability of active principles, optimizing biological activity while at the same time reducing compound toxicity.

Duguetia stelechantha (Diels) R.E.Fr. (synonym *Aberemoa stelechantha*), popularly known as “ata brava”, “envira amarela” and “envirataia” in Brazil, belongs to the Annonaceae family *Duguetia* genus (SiBBR, 2022). The *Duguetia* genus, in particular, is very abundant in Brazil, with about 100 species identified to date in the country (Monteiro et al., 2022; Lobão, 2023). *D. stelechantha* is geographically distributed throughout in the states of Amazonas, Pará, and Rondônia, although it is also non-endemic to Brazil, and found in Colombia and Bolivia (Lobão, 2023; GBIF.org, 2022).

Chemical and biological studies on this species are scarce. In this regard, we postulate that *D. stelechantha* contains secondary metabolites, such as terpenes, with biotechnological potential, i.e., biological activities that may be employed as a source of new drugs. Furthermore, the effects of these compounds can be enhanced when incorporated into certain formulations, such as microemulsions (ME), which are thermodynamically stable and increase the bioavailability of active principles, optimizing biological activity while at the same time reducing compound toxicity.

In this context, the aim of the present study was to chemically characterize the essential oil (EO-DU) obtained from *D. stelechantha* for the first time and assess potential antileishmanial action against *L. (Leishmania) amazonensis* promastigotes and cytotoxicity against RAW 264.7 macrophages of a EO *D. stelechantha* microemulsion (EO-ME).

2. Material and methods

2.1. Collection of plant material

The plant material of *D. stelechantha* was collected in São Bento, Maranhão, Brazil, in the Grajaú district (02°43'56.8 "S; 044°51'27.9 "W). The botanical identification of the plant is catalogued at Herbario Rosa Mochel, São Luís, Maranhão, Brazil, under the registration number SLUI005612. This species was collected and registered according to the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen) under number AA3D4EE.

2.2. Extraction of the essential oil

The leaves of the species underwent a drying process at room temperature for 48 h. Then, from 300 g of the sample, the essential oil from *D. stelechantha* was obtained by hydrodistillation using the Clevenger system (Fabrowski, 2022). The oils were dried over anhydrous sodium sulfate P.A and centrifuged. (ISO FAR, RJ, Brazil). The yields were calculated based on the dry weight of the plant material (Lima et al., 2022).

2.3. Oil-composition analysis and microemulsion

The oil analysis was performed in a Shimadzu Gas Chromatograph (GC-2010) coupled to a Mass Spectrometer (GCMS-QP2010 Plus). The sample was prepared with 2 µL of the oil diluted in 500 µL of *n*-hexane. A DB-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) was used with helium carrier gas flow at a linear velocity of 39.5 cm/s (1.0 mL/min). The oven setting was 40–240 °C (10 °C/min.). The temperature of the injector and ion source was 250 °C and 200 °C, respectively. The retention indices were calculated for all volatile components using a homologous series of C₈–C₂₀ *n*-alkanes (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), according to the linear equation of Van den Dool and Kratz

(1963). The components of oils were identified by comparing their retention indices and mass spectra (molecular mass and fragmentation pattern) with data stored in the Adams (2007) and NIST libraries (Adams, 2007; Lias et al., 2022).

For the analysis of the microemulsion by the headspace method, the following chromatographic conditions were used: sample volume of 500 µL; Syringe: 2.5 mL – HS; Incubation temperature: 85 °C; Incubation time: 5 min; Stirring speed - Speed: 250 rpm; Fill speed: 100 µL/s.

2.4. Physicochemical characterization of the essential oil

The pH was evaluated using a digital potentiometer with a glass electrode (PHS3BW, BEL Engenharia) and the refractive index was determined with an ABBE refractometer (QUIMIS, Q767B), according to Ciríaco et al. (2020). Moisture content was checked just before EO extraction, using Infrared Moisture Analyzer (IV2500 GEHAKA). Density was calculated based on the mass and volume of the EO-DU.

2.5. Development of microemulsion and incorporation of essential oil

The microemulsion (ME) was formulated according to Ciríaco et al. (2020), with method modifications. The surfactants used were Tween 80 and Transcutol P. Initially, the surfactants were mixed in a 1:1 ratio, under magnetic stirring. Then, distilled water was titrated to the mixture of surfactants in proportions (weight/weight) 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2–9:1. From the prepared formulations, the pseudo-ternary phase diagram was constructed, which indicated the proportion of the ideal ME formulation. Afterwards, the EO was incorporated into the system at a concentration of 20 %. The ME formulation has the following composition (Table 1S):

2.6. Physicochemical characterization of the microemulsion

The globule size (z-average diameter), polydispersity index (PDI) and zeta potential were measured by Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, UK) at 25 °C at a 90° angle. The observations were performed in triplicate following a proper dilution (1:100) of the formulations in distilled water.

The thermal stability of ME was analyzed by 6 freeze-thaw cycles, where in each cycle the sample was submitted to – 5 °C ± 2 °C for 24 h in a refrigerator (Electrolux, Brazil) and at 50 °C ± 2 °C for 24 h in an oven (SolidSteel, Brazil) (Brazil, 2004; Figueiredo, 2013). Before and after the thermal stability test, the EM was analyzed at 25 °C, in relation to density, pH and refractive index, according to Ciríaco et al. (2020).

2.7. Culture of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* N promastigotes

Promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* (MHOM/Br/90/BA125) in the stationary growth phase (4 days of culture) with flagellar motility were cultured in Schneider's medium supplemented with 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, Brazil). The culture was maintained in Biochemical Oxygen Demand (B.O.D) (Labor, SP-500, São Paulo, Brazil) incubator at 26 °C (Bezerra et al., 2006; Reis et al., 2012).

2.8. Leishmanicidal activity

For the assay, we used the methodology of Reis et al. (2012) with adaptations, in which promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* (5 × 10⁷ cells/mL) were treated with 6 different concentrations (500–15.62 µg/mL) of the EO-DU and EM-BLANK, and 9 different concentrations (500–1.95 µg/mL) of EO-ME, in 96-well plates containing a final volume of 100 µL in each well. The negative control was performed with the promastigote forms cultured in Schneider's (Sigma-Aldrich, USA) medium supplemented with 10 % FBS. The positive control was determined by the standard drug Pentamidine® (Sanofi aventis, Anagni, Italy) (IC₅₀ 4 µg/mL) on the parasite grown in the supplemented medium. The

Table 1Volatile composition of the essential oil extracted from *Duguetia stelechantha* leaves.

Constituent	RT	RI _(L)	RI _(C)	Leaves oil %
1-octene	5.220	788 ¹	783	2.91
(3)-hexenol	7.940	850 ¹	860	0.03
α-thujene	9.950	924 ¹	926	0.03
α-pinene	10.120	932 ¹	933	20.2
camphene	10.515	946 ¹	950	0.38
thuja-2,4(10)-diene	10.620	953 ¹	955	0.02
6-methyl-Heptan-2-ol	10.730	958 ¹	959	0.09
sabinene	11.090	969 ¹	974	1.75
β-pinene	11.195	974 ¹	979	46.17
myrcene	11.480	988 ¹	991	1.14
p-mentha-1(7),8-diene	11.760	1003 ¹	1003	0.03
α-terpinene	12.035	1014 ¹	1018	0.12
o-cymene	12.195	1022 ¹	1026	0.03
limonene	12.285	1024 ¹	1031	1.18
β-phellandrene	12.315	1025 ¹	1033	0.39
1,8-cineole	12.380	1026 ¹	1034	0.35
γ-terpinene	12.855	1054 ¹	1061	0.2
terpinolene	13.360	1086 ¹	1088	0.18
endo-fenchol	13.980	1014 ¹	1123	0.03
α-campholenal	14.105	1022 ¹	1131	0.01
trans-sabinol (trans for OH vs. IPP)	14.355	1137 ¹	1146	1.72
p-mentha-2,8-dien-1-ol	14.425	1040 ²	1150	0.08
pinocarvone	14.715	1160 ¹	1168	0.82
p-mentha-1,5-dien-8-ol	14.850	1166 ¹	1176	0.15
cryptone	15.110	1183 ¹	1192	0.06
myrtenal	15.250	1195 ¹	1200	3
verbenone	15.440	1204 ¹	1213	0.03
α-copaene	17.905	1374 ¹	1384	0.37
β-cubebene	18.060	1387 ¹	1395	0.06
aromadendrene	18.525	1439 ¹	1431	2.19
trans-cadina-1(6),4-diene	19.175	1475 ¹	1481	0.02
γ-murolene	19.210	1478 ¹	1483	0.15
trans-murola-4(14),5-diene	19.315	1493 ¹	1492	0.55
bicyclogermacrene	19.500	1500 ¹	1506	2.25
β-bisabolene	19.590	1505 ¹	1513	0.19
δ-cadinene	19.740	1522 ¹	1526	1.77
α-calacorene	20.050	1544 ¹	1551	0.6
β-calacorene	20.305	1564 ¹	1572	0.12
spathulenol	20.510	1577 ¹	1589	6.68
cis-cadin-4-en-7-ol	21.100	1635 ¹	1639	0.13
α-murolol (=Torreyol)	21.275	1644 ¹	1654	0.22
Monoterpene hydrocarbons				71.82
Sesquiterpene hydrocarbons				8.27
Oxygenated sesquiterpenes				7.03
Oxygenated monoterpenes				6.25
Others				3.03
Total Identified				96.4

¹[Adams (2007)]; ²[(Lias et al., 2022)]; RI_(C): Calculated Retention Index (Rxi-5 ms column); RI_(L): Literature Retention Index; RT: Retention times.

medium and diluent, 0.5 % dimethyl sulfoxide (DMSO), were also controlled together with the parasite grown in the supplemented medium. After 48 h of incubation at 26°C in the B.O.D., motility was evaluated, readings were taken in a microplate reader (BioTek EL×800) at 540 nm, and the MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-bromide tetrazolium] (Sigma-Aldrich, USA) method was used to evaluate cytotoxicity, as described later. The tests were performed in triplicate, with 3 repetitions. The 50 % inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated with the absorbance values obtained.

2.9. Cytotoxicity Assay on Macrophages

To evaluate in vitro cytotoxicity, RAW 264.7 macrophage cell lines (2 × 10⁵ cells/mL) were used and cultured, at 37 °C and 5 % CO₂, in a 96-well plate with 6 different concentrations (500–15.62 µg/mL) of the EO-DU and EM-BLANK, and 8 different concentrations (500–3.90 µg/mL) of EO-ME. The tests were performed in triplicate, with 3 repetitions, according to the methodology of Tempone et al. (2005), with adaptations. The negative control was checked in wells with cells and RPMI

medium (Roswell Park Memory Institute) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) supplemented with 10 % FBS. The positive control was determined in the wells with the cells and 0.5 % DMSO. A medium control was also performed. The plates were incubated for 48 h, and after this period, the cells were analyzed by the MTT colorimetric method, and read in the microplate reader (BioTek EL×800) at 540 nm. With the absorbance values, the results were used to calculate the 50 % cell cytotoxicity (CC₅₀).

2.10. MTT assay

The cell viability of *L. (L.) amazonensis* promastigotes and RAW macrophages was verified by the MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazole)-2,5-diphenyl-bromide tetrazolium] method. At the end of incubation, the plates were centrifuged (Thermo Fisher Scientific Centrifuge), and the supernatant was removed and replaced with fresh medium containing MTT (5 mg/mL). The plates were incubated at B.O.D for 3 h, and after this period, the plates were centrifuged again and the formazan crystals dissolved in 100 µL of pure DMSO. The absorbances were read on the microplate reader (BioTek EL×800) at 540 nm (Kumar et al., 2018). To finalize the study, the Selectivity Index (I.S.), which determines the safety of using the sample in vitro assays, was calculated. The I.S. was determined by the ratio between the CC₅₀ and IC₅₀. The I.S. greater than 1 means that the sample shows higher toxicity to the parasite than to the cell. Whereas, the I.S. less than 1 results that the sample has higher toxicity to the cell than to the parasite. Thus, the higher the I.S., the more selective the sample is to the parasite and the less toxic to the cell (Silva-Silva, 2016).

2.11. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Inc., San Diego, USA), where data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and differences between means were determined by Tukey's test (p ≤ 0.05) in order to obtain the mean, 50 % inhibitory concentration (IC₅₀) and cytotoxic concentration (CC₅₀).

3. Results and discussion

3.1. Oil composition analysis

The oil yield was 1.37 % and volatile composition of the essential oil (EO) extracted from *D. stelechantha* are displayed in Table 1. Forty-one volatile EO compounds were identified by GC-MS, comprising about 96.4 % of the total oil composition (Table 1 and Fig. 1S).

A high oil content (1.37 %) was observed in *D. stelechantha* compared to previous studies conducted with the leaves of other *Duguetia* species also found in Brazil, such as *D. furfuracea* (A. St. Hil.) Saff. (0.8 %), *D. lanceolata* St. Hil. (0.3 %), and *D. gardneriana* Mart. (0.13 %) from the states of Minas Gerais, São Paulo, and Sergipe, respectively (Rodrigues et al., 2015; Maia et al., 2020; Ribeiro et al., 2020).

To date, no reports on the volatile chemical composition of *D. stelechantha* are available. The EO extracted herein is composed predominantly of monoterpenes hydrocarbons (71.82 %), followed by sesquiterpene hydrocarbons (8.27 %), oxygenated sesquiterpenes (7.03 %), and minor amounts of oxygenated monoterpenes (6.25 %). The major oil components were β-pinene (46.17 %), α-pinene (20.2 %), and spathulenol (6.68 %).

The chemical EO profiles of several *Duguetia* species found in Brazil have been reported as containing mono- and sesquiterpenes, with the most frequent and representative compounds comprising germacrene D, bicyclogermacrene, spathulenol, caryophyllene oxide, humulene epoxide II, viridiflorene, β-pinene, α-pinene, and β-caryophyllene, all considered chemophenetic *Duguetia* species EO markers (Santos et al., 2022). These compounds EOs of the *Duguetia* genus also are highlighted among the genera of Annonaceae family, such as *Annona*, *Anaxagorea*,

Table 2

Characterization of the microemulsion obtained from *Duguetia stelechantha* by the Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry headspace method.

Volatile profile			Abundance, fragmentation, and molecular ion		
Compound	RT		Area (%)	MI	Fragments (%)
1	toluene	4.445	0.05	92 (M ⁺)	91 (100); 92 (63); 40 (56)
2	hexanal	5.340	0.13	98 (M ⁺)	56 (100); 44 (77); 57 (62)
3	2-hexenal	6.685	0.03	98 (M ⁺)	55 (100); 41 (78); 69 (61)
4	tricyclene	8.270	0.09	136 (M ⁺)	93 (100); 92 (25); 91 (27)
5	α-thujene	8.365	0.51	136 (M ⁺)	93 (100); 91 (55); 92 (37)
6	α-pinene	8.605	25.5	136 (M ⁺)	93 (100); 92 (41); 91 (40)
7	camphene	8.885	1.21	136 (M ⁺)	93 (100); 121 (73); 79 (36)
8	thuja-2,4(10)-diene	8.960	0.13	134 (M ⁺)	91 (100); 92 (48); 119 (19)
9	β-pinene	9.600	46.86	136 (M ⁺)	93 (100); 69 (40); 41 (39)
10	myrcene	9.700	2.76	136 (M ⁺)	93 (100); 41 (73); 69 (70)
11	p-mentha-1(7),8-diene	9.985	0.45	136 (M ⁺)	93 (100); 79 (40); 91 (22)
12	α-phellandrene	10.050	5.67	136 (M ⁺)	93 (100); 91 (49); 77 (34)
13	δ-3-carene	10.085	1.74	136 (M ⁺)	93 (100); 91 (42); 92 (29)
14	α-terpinene	10.230	0.28	136 (M ⁺)	121(100); 93 (85); 91 (42)
15	p-cymene	10.385	2.54	134 (M ⁺)	119 (100); 134 (29); 91 (26)
16	limonene	10.495	5.74	136 (M ⁺)	93 (100); 68 (96); 67 (66)
17	β-phellandrene	10.525	4.21	136 (M ⁺)	93 (100); 91 (36); 77 (33)
18	(E)-β-ocimene	10.755	0.08	136 (M ⁺)	93 (100); 91 (48); 80 (42)
19	γ-terpinene	10.990	0.26	136 (M ⁺)	93 (100); 91 (50); 121 (30)
20	p-mentha-2,4(8)-diene	11.475	0.58	136 (M ⁺)	93 (100); 121 (93); 136 (64)
21	p-cymenene	11.555	0.01	132 (M ⁺)	117 (100); 132 (84); 115 (49)
22	perillene	11.680	0.02	150 (M ⁺)	69 (100); 81 (75); 41 (63)
23	nopinone	12.425	0.03	138 (M ⁺)	83 (100); 55 (60); 81 (36)
24	trans-pinocarveol	12.465	0.19	152 (M ⁺)	92 (100); 55 (99); 91 (65)
25	pinocarvone	12.810	0.24	150 (M ⁺)	53 (100); 81 (90); 108 (69)
26	terpinen-4-ol	13.095	0.05	154 (M ⁺)	71 (100); 111 (56); 93 (54)
27	cryptone	13.200	0.07	138 (M ⁺)	71 (100); 111 (56); 93 (54)
28	myrtenal	13.340	0.23	150 (M ⁺)	79 (100); 107 (53); 91 (38)
29	(E)-caryophyllene	16.610	0.02	204 (M ⁺)	93 (100); 133 (85); 91 (83)
Monoterpene hydrocarbons			98.64		
Oxygenated monoterpenes			0.78		
Sesquiterpene hydrocarbons			0.02		
Others			0.24		
Total Identified			99.68		

RT = Retention times. MI = molecular ion.

Fusae, *Xylopi*, *Guatteria*, *Hexalobus*, and *Pachypodanthium*) (Zidorn, 2019). The occurrence of pinene-type monoterpenes in *Duguetia* species has been reported previously, with α-pinene described as the main constituent and β-pinene as present at minor concentrations in leaf and

stem EO samples obtained from *D. trunciflora* (Maia et al., 2006). These compounds are also among the most abundant in leaf EO extracted from *D. gardneriana* (Almeida et al., 2010), *D. moricandiana* (Almeida et al., 2010), and *D. riparia* (Maia et al., 2006), and present in minor amounts in *D. asterotricha* (Jürgens et al., 2000) flowers and *D. riparia* stems (Maia et al., 2006).

Herein, spathulenol was identified in smaller amounts, similar to EOs obtained from the leaves and fine stems of *D. eximia* (Maia et al., 2006), the bark of *D. flagellaris* (Maia et al., 2006), the leaves of *D. glabriuscula* (Siqueira et al., 2003), and bark of *D. furfuracea* (Silva et al., 2007). However, spathulenol has been reported as a significant constituent in EOs extracted from the leaves and fine stems of *D. flagellaris*, *D. pycnastera* and *D. riparia* (Maia et al., 2006), and the leaves of *D. furfuracea* (Vidotto et al., 2013).

In terms of chemical profiles of the leaves of the *Duguetia* genus, the literature reports species rich in spathulenol and bicyclogermacrene such as *D. furfuracea*; and α-selinene, aristolochene, (E)-calamenene, and (E)-caryophyllene in the *D. lanceolata*, both collected in Minas Gerais (Brazil) (Maia et al., 2020). β-Bisabolene and elemicin were identified in the *D. gardneriana*, collected in Sergipe (Brazil) (Rodrigues et al., 2015). These variations and the identification of new major constituents in *Duguetia* species may be associated to different factors, such as climate, geographical location, soil characteristics, fertilization levels, and season (Costa et al., 2022). The EO-DU density observed herein was of 0.869 g/mL, similar to the value observed in another Annonaceae species from the same family as *D. stelechantha*, namely *Guatteria citriodora* Ducke (0.8815 g/mL) (Rabelo et al., 2008). The hydrogen potential of the EO-DU was 4.95 and the refractive index, 1.477.

The headspace analysis of the prepared ME identified 29 components, representing 99.68 % of the total ME composition (Fig. 2S). The most representative class determined in both ME and EO consisted in monoterpene hydrocarbons (98.64 %), followed by oxygenated monoterpenes (0.78 %) and sesquiterpene hydrocarbons (0.02 %) in EM (Table 2).

The main compounds identified in the ME headspace analysis were β-Pinene (46.86 %), α-pinene (25.5 %), and limonene (5.74 %) (Table 2). These compounds were also detected in EO, with β-Pinene and α-pinene present at the highest percentages in both EO and ME. Compounds corresponding to 88.45 % of the total ME composition were also present in the extracted EO.

Some compounds identified in the ME headspace analysis reported as a part of the chemical profile of EOs of *Duguetia* species occurring in Brazil were not identified in the EO assessments, such as α-phellandrene and terpinen-4-ol reported for the EO obtained from *D. furfuracea* leaves, p-Cymene detected in the EO extracted from *D. asterotricha* flowers and *D. furfuracea* leaves and (E)-caryophyllene obtained from the EO extracted from *D. furfuracea* leaves and stems and the aerial parts of *D. quitarensis*, among others (Santos et al., 2022).

The presence of these substances indicates that the EO was incorporated into the EM formulation, as expected, and that the active principles of the EO sample were preserved, enhancing biological activity.

3.2. Physicochemical microemulsion characterization

The formulated ME represents an oil-water microemulsion. This type

Table 3

Characterization of the microemulsion formulated with *Duguetia stelechantha* essential oil and the microemulsion blank in relation to droplet size, polydispersion index and zeta potential.

Formulation	Droplet size (nm)	Polydispersion index	Zeta potential (mV)
EO-ME	32.35 ± 0.492	0.498 ± 0.006	-22.6
EM-BLANK	17.18 ± 8.432	0.348 ± 0.073	- 25.0

Table 4Characterization of the microemulsion formulated with the essential oil extracted from *Duguetia stelechantha* before and after the thermal stability test.

Samples	Density (g/mL)		pH		Refractive index	
	Before	After	Before	After	Before	After
EO-ME	0.99 ± 0	0.99 ± 0.02	7.4 ± 0.28	5.7 ± 0.03	1.43 ± 0	1.43 ± 0
EM-BLANK	0.99 ± 0	1.02 ± 0.02	6.81 ± 0.27	6.5 ± 0.30	1.42 ± 0	1.42 ± 0

of ME, tends to form mixed micelles when in infinite dilution, composed of the oil phase contained and dissolved in the hydrophobic interior of the micelle (Oliveira et al., 2004). The microemulsion droplet size, polydispersion index and zeta potential are displayed in Table 3.

The EM droplet size (32.35 nm) was determined as predicted in the literature, between 10 and 150 nm (Silva et al., 2009). The nanometric size of the ME blank (ME-BLANK) droplets (17.18 nm) is also in accordance with previous reports.

The polydispersion index (PDI) of EO-ME (0.498) and ME-BLANK (0.348) were also as proposed in the literature, with values lower than 0.5 indicating droplet size homogeneity (Üstündağ Okur et al., 2011).

The zeta potential indicated negative values for both the EO-ME and ME-BLANK, of − 22.6 mV and − 25 mV, respectively. Stable systems exhibit zeta potential equal to or greater than 20 mV (Bose et al., 2013).

This parameter can be either positive or negative and is associated to oil particle or ME surfactant charges (Bedin, 2011). Negative Zeta potentials can be attributed to the presence of chemical surfactant groups, which ionize, forming negatively charged particles. Therefore, MEs formulated with non-ionic surfactants, such as Tween 80, used herein, may be stable even with negative zeta potentials (Aggarwal et al., 2013).

Studies employing non-ionic surfactants have also investigated negative zeta potential values. Nanoemulsion prepared with the EO extracted from *Cymbopogon martinii* and the surfactants Tween 20 and Span 80 obtained a zeta potential from − 16.6 mV to − 34.5 mV (Lyra, 2019), while microemulsion obtained from the EO extracted from *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon nardus*, respectively, with the surfactants labrasol, plulol oleique and isopropyl myristate reported − 38.3 mV and − 52.8 mV (Pires, 2014).

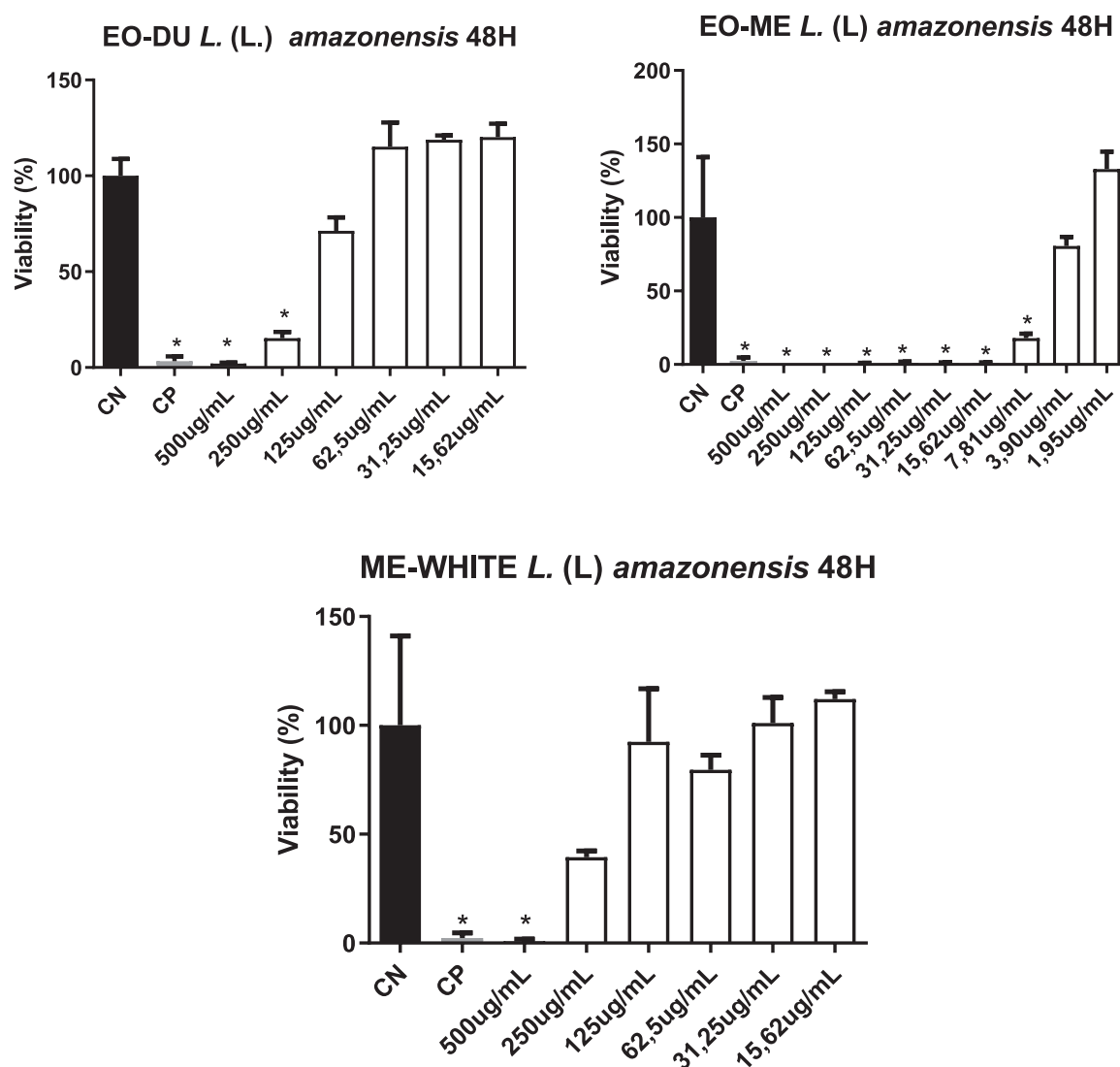


Fig. 1. Viability of *L. (L) amazonensis* promastigotes treated for 48 h with the essential oil extracted from *Duguetia stelechantha*, with the microemulsion prepared with this oil and with the microemulsion blank. CN = negative control; CP=positive control; *Asterisks indicate statistically significant differences in relation to the negative control at $p < 0.05$.

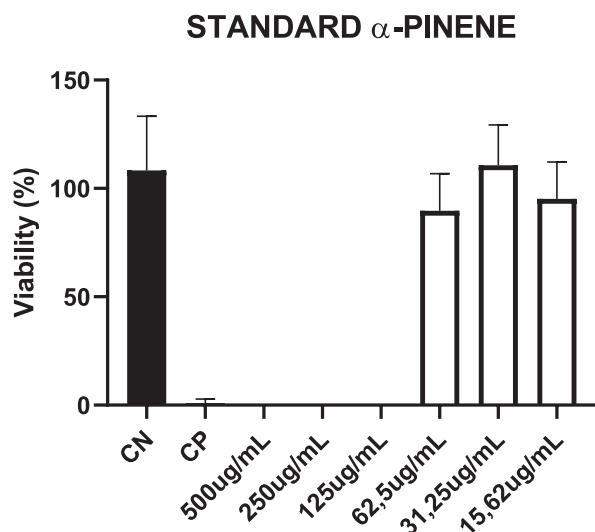


Fig. 2. Viability of *L. (L) amazonensis* promastigotes treated for 48 h with the α -pinene standard. CN = negative control; CP=positive control; *Asterisks indicate statistically significant differences in relation to the negative control at $p < 0.05$.

The thermal stability test indicated that ME stability, with no visual alterations.

The density of the EO-ME (0.99 g/mL) was not altered by the heat treatment, while ME-BLANK density increased from 0.99 g/mL to 1.02 g/mL (Table 4). Similar values have been reported in the literature. Density of 1.04 g/mL for an ME obtained from *Baccharis dracunculifolia* EO (Leite, 2009), and density ranging from 0.99 to 1.002 g/mL for a nanoemulsion prepared with the EO extracted from *Cymbopogon martinii* (Lyra, 2019).

The ME presented a pH value of 7.4, and the blank, 6.81. Following the thermal stability test, the pH of the EO-ME was reduced to 5.7 and the pH of the blank, to 6.5. Emulsified formulations containing Brazil nut oil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) also reported a pH decrease following a thermal stability test, ranging from 6.5 to 6.0 (Marino, 2018). Even with this decrease, the pH remained within the physical and chemical stability range for both formulations and topical use formulations, from 5.5 to 8.0, close to skin pH values. The EO-ME obtained herein is, therefore, skin-compatible (Fronza et al., 2004; Silva et al., 2009).

The refractive index of the EO-ME and ME-BLANK, 1.43 and 1.42, respectively, remained constant before and after the thermal stability test. Similar values from 1.412 to 1.447 were reported for microemulsion obtained from copaiba oil (*Copaifera multijuga*) (Neves, 2013).

3.3. Cytotoxicity against *L. (Leishmania) amazonensis*

The antileishmanial activity of EO-DU against *L. (L) amazonensis* promastigotes caused 50 % parasite growth inhibition (IC_{50}) at 138.3 μ g/mL. The EO-ME formulation was able to reduce the EO-DU IC_{50} to 4.47 μ g/mL. Therefore, an EO-DU dose about 30-fold lower is required to inactivate the same amount of *L. (L) amazonensis* when incorporated into the ME. The ME IC_{50} value is close to that determined for the standard drug used as a positive control, Pentamidine®, of 4 μ g/mL (Fig. 1). Thus, the EO-ME displayed a more efficient antileishmanial activity compared to the EO-DU, due to a lower parasite inhibition concentration than the EO-DU.

A sample is considered active against leishmania promastigote forms when the IC_{50} is of 100 μ g/mL or less, moderately active when between 101–200 μ g/mL and inactive when greater than 200 μ g/mL (Mota et al., 2016). Therefore, our EO-DU is classified moderately active.

The α -pinene standard, which is one of the major compounds in EO-

DU, was also tested and presented an IC_{50} = 64.78 μ g/mL (Fig. 2), being considered active against the verified parasites.

Different Annonaceae species have been reported as biologically active (Santos et al., 2022). For example, the EO obtained from the aerial parts of *Duguetia quitarensis* display anti-protozoan activity against *Trypanosoma cruzi*, with an IC_{50} of less than 0.54 μ g/mL (Bay et al., 2019).

The mechanism of action of terpenes allows for their interaction with parasite plasma membranes, altering cell membrane permeability and composition. This in turn leads to electrolyte imbalances, negative mitosis regulation and nutrient efflux, inducing apoptosis or cell lysis. Terpenes also alter the nucleus and mitochondria, cause oxidative stress, suppress cell proliferation modulators and inhibit enzymes (Sakya et al., 2021; Hellmann et al., 2018; Meneguetti et al., 2015).

In the present study, the antileishmanial effect of the EO-DU was less effective in comparison to Pentamidine®, although this can be reversed by using formulations that promote longer volatile molecule lifetimes. In this regard, biotechnology has allowed for the development of natural compound protection techniques against environmental conditions, offering greater stability, and bioavailability and consequently, increasing biological activity action time (Lima et al., 2017).

The EO-ME formulated herein is configured as an active sample, while the microemulsion blank (vehicle) exhibited moderately active activity, with the highest IC_{50} value of 185.6 μ g/mL (Fig. 1) when compared to the EO-DU and EO-ME. This indicates that antileishmanial EO-ME activity is being carried out by the bioavailability of the active principles of the oil incorporated in the ME formulation, and not by the employed surfactants.

3.4. Cytotoxicity against RAW 264.7 macrophages

The EO-DU presented a cytotoxic concentration able to reduce 50 % of macrophage viability (CC_{50}) of 44.77 μ g/mL, while the EO-ME presented a CC_{50} of 8.87 μ g/mL and the ME-blank, 62.65 μ g/mL (Fig. 3). When the CC_{50} is equal or lower than 100 μ g/mL, samples are considered cytotoxic (Silva-Silva, 2016). Therefore, the EO-DU, EO-ME, and ME-blank exhibit are cytotoxic against RAW 264.7 macrophages, leading to low EO-DU and ME-blank selectivity index against *L. (L) amazonensis* and high EO-ME selectivity. The Selectivity Index (S.I.) indicates whether a sample show exhibits higher toxicity against the parasite or the cell.

The EO-DU displayed an IC_{50} above the CC_{50} (Table 5), reaching a S.I. of less than 1 (0.32), which indicates that the oil is more toxic to cells than to the parasite, demonstrating cell disruption.

The EO-ME displayed an IC_{50} below the CC_{50} , resulting in a S.I. greater than 1 (1.98), demonstrating that the EO-ME is more selective towards parasite inhibition, as the inhibitory concentration indicated for the studied protozoan is lower than that considered cytotoxic (Table 5). Thus, the use of *D. stelechantha* EO when associated with ME against the leishmania protozoan is safe. The ME-blank, as well as the EO-DU, also presented an S.I. below 1 (0.34) (Table 5), indicating greater cytotoxicity compared to parasite toxicity.

An EO-DU cytotoxicity against RAW 264.7 macrophages was expected, since the lipophilic character of terpenes present in EOs can generate high affinity and, thus, interaction with cell membrane components, resulting in membrane permeability and integrity alterations, changes in structural osmoregulatory capacity, phospholipid layer disruption with ions or cell contents extravasation, which can cause cell death (Nogueira, 2019). Likewise, it is expected that the ME vehicle (EM-BLANK) will be cytotoxic, as the surfactants used in ME systems can interact with cell membrane components, resulting in phospholipid layer disruption, which may cause structure rupture (Braga, 2002 apud Romanelli, 2004).

The cytotoxicity of lipophilic samples, inot be considered a limitation for use, as lipophilic sample affinity to the plasma cell membrane may significantly influence verified cytotoxicity (Brustolin et al., 2022). Despite the low selectivity of the EO-DU for the evaluated parasite, EOs

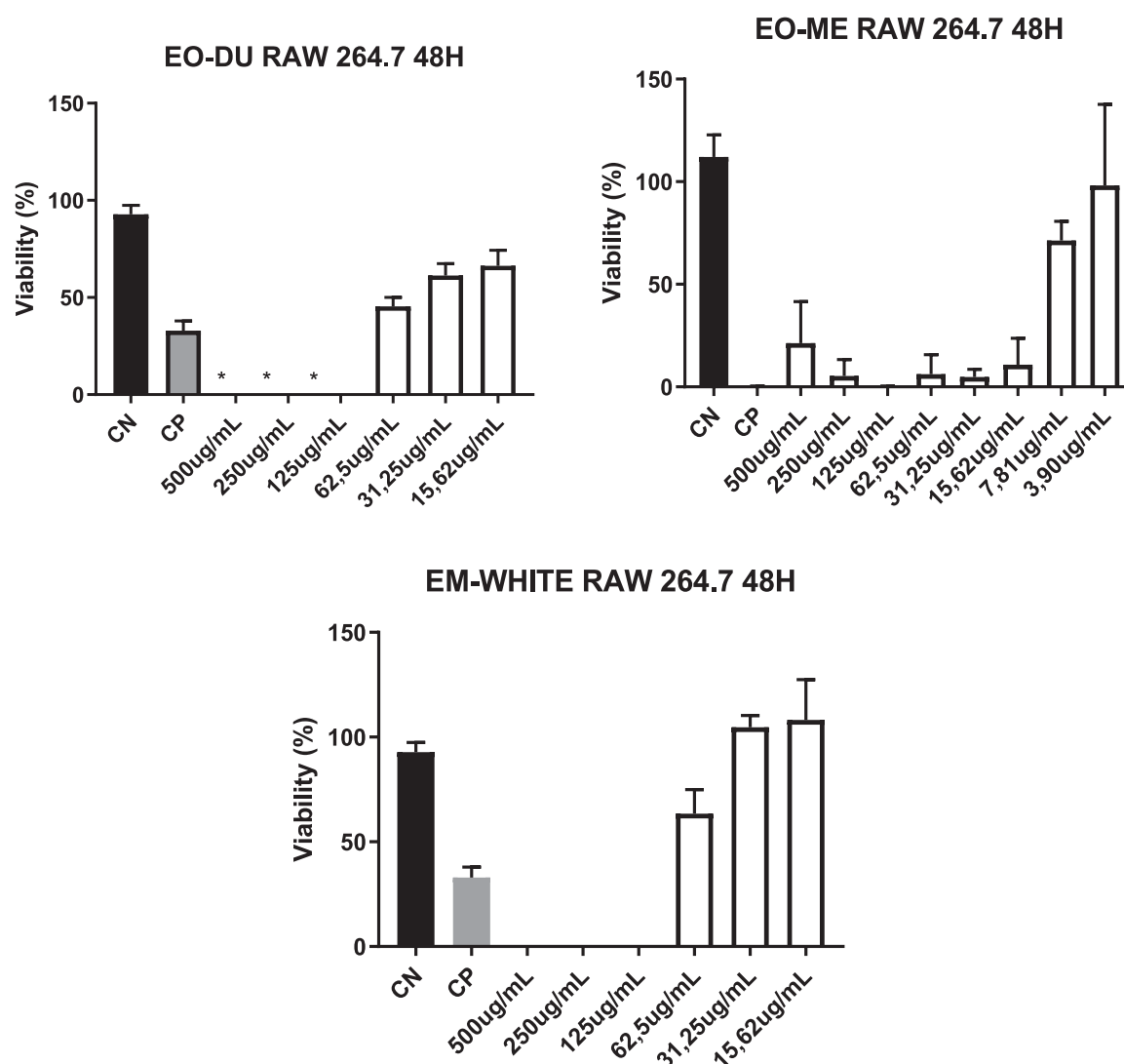


Fig. 3. Cytotoxic activity of the essential oil extracted from *D. stelechantha*, from the microemulsion prepared with this oil and from the microemulsion blank against RAW 264.7 macrophages. CN = negative control; CP=positive control; *Asterisks indicate statistically significant differences in relation to the negative control at $p < 0.05$.

Table 5

Inhibition concentration (IC_{50}), cytotoxic concentration (CC_{50}) and Selectivity Index (S.I) values of the *Duguetia stelechantha* essential oil, the microemulsion prepared with this oil and the microemulsion blank.

48 h	PROMASTIGOTE <i>L. (L.) amazonensis</i> IC_{50} (μ g/mL)	MACROPHAGES RAW 264.7 CC_{50} (μ g/mL)	S.I
EO-DU	138.3	44.77	0.32
EO-ME	4.47	8.87	1.98
EM-BLANK	185.6	62.65	0.34

are excellent potential antileishmanial compounds. Describes the antileishmanial potential of approximately 35 plant EO against *Leishmania amazonensis* forms, reporting that 45.7 % exhibited $10 < IC_{50} \leq 50 \mu$ g/mL (Silva et al., 2020). Pharmaceutical formulations using EO-DU can be key to greater EO selectivity against the parasite and less to cells.

These findings confirm that ME potentiate the effect of bioactive substances, as due to increased system solubilization, stability and active principle bioavailability, biological activity optimization and decreased compound toxicity.

4. Conclusion

The incorporation of natural products, such as the EO extracted from the leaves of *Duguetia stelechantha*, in microemulsions optimizes the bioavailability of bioactive principles, improving the potential of biological activities, such as the antileishmanian action. The major compounds detected in the EO, α -pinene, β -pinene and spathulenol, showed a moderate effect against *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes, while the ME, with these more bioavailable compounds, was considered active against these parasites, showing a high selectivity index. Thus, we proved that the formulations composed with natural products can be used for the development of new drugs.

Funding sources

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001, PROCAD-AM [88887.472618/2019-00 (CQR)] and FAPEMA (Proc.: INFRA-02263/21).

CRediT authorship contribution statement

Auxiliadora C.C. Barata Lope: Methodology, Validation, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft. **Marcos B.P. Camara:** Methodology, Validation, Investigation. **Aldilene S. Lima:** Conceptualization, Investigation, Writing – review & editing. **Matheus Oliveira do Nascimento:** Methodology, Validation, Investigation. **Júlia Karla A. M. Xavier:** Methodology, Validation, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft. **Caroline M. de Jesus:** Methodology, Validation, Investigation. **Cárta J.S. Mendonça:** Methodology, Validation, Investigation. **André Luis M. Carvalho:** Methodology, Validation, Investigation. **Lucilene A. Silva:** Conceptualization, Investigation, Resources, Writing – review & editing. **Cláudia Q. da Rocha:** Methodology, Validation, Conceptualization, Investigation, Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing, Project administration, Funding acquisition, Formal analysis.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data Availability

No data was used for the research described in the article.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.indcrop.2023.116978](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116978).

References

- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation.
- Aggarwal, N., Goindi, S., Khurana, R., 2013. Formulation, characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 105, 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.01.004>.
- Almeida, J.R.G.S., Facanali, R., Vieira, M.A.P., Marques, M.O.M., Lúcio, A.S.S.C., Lima, E.O., Agra, M.F., 2010. Composition and Antimicrobial Activity of the Leaf Essential Oils of *Duguetia gardeniera* Mart. and *Duguetia moricandiana* Mart. (Annonaceae). *J. Essent. Oil Res.* 22 (3), 275–278.
- Bay, M., Oliveira, J.V.S., Sales Junior, P.A., Murta, S.M.F., Santos, A.R., Bastos, I.S., Orlandi, P.P., Sousa Junior, P.T., 2019. In vitro trypanocidal and antibacterial activities of essential oils from four species of the family annonaceae. *Chem. Biodivers.* 16 (11) <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900359>.
- Bedin, A.C., 2011. Nanoemulsões contendo Benzoilmetronidazol: Desenvolvimento, Caracterização e Estudo de Liberação in vitro.
- Bezerra, J.L., Costa, G.C., Lopes, T.C., Carvalho, I.C.D.S., Patrício, F.J., Sousa, S.M., Amaral, F.M.M., Manuel, J., Rebelo, M., Guerra, R.N.M., Nilce, M., Ribeiro, S., Nascimento, F.R.F., 2006. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. *Rev. Bras. De Farmacogn.* 16, 631–637.
- Bose, S., Du, Y., Takhistov, P., Michniak-Kohn, B., 2013. Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems. *Int. J. Pharm.* 441 (1–2), 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.12.013>.
- Brustolin, A.A., Ramos-Milare, A.C.F.H., Mello, T.F.P., Aristides, S.M.A., Lonardoni, M.V.C., Silveira, T.G. v., 2022. In vitro activity of cinnamaldehyde on *Leishmania* (Leishmania) amazonensis. *Exp. Parasitol.* 236–237. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108244>.
- Ciríaco, S.L., Carvalho, I.P.S., Terceiro Neto, J.A., Lima Neto, J.S., de Oliveira, D.H.B., Cunha, A.P.G.P., Cavalcante, Y.T.D., da Silva, D.T.C., da Silva, J.A., Mineiro, A.L.B., de Lima Chagas Moreno Fernandes, M.Z., Carvalho, A.L.M., 2020. Development of microemulsion of tamsulosin and dutasteride for benign prostatic hyperplasia therapy. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 185. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110573>.
- Costa, E.V., de Souza, C.A.S., Galvão, A.F.C., Silva, V.R., Santos, L. d S., Dias, R.B., Rocha, C.A.G., Soares, M.B.P., da Silva, F.M.A., Koolen, H.H.F., 2022. *Duguetia pycnastera* Sandwith (Annonaceae) Leaf Essential Oil Inhibits HepG2 cell growth in vitro and in vivo. *Molecules* 27, 37.
- van den Dool, H., Kratz, P.D., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 11, 463–471. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X).
- Fabrowski, F.J., 2022. *Eucalyptus smithii* R. T. Baker (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil.
- Fronza, T., Campos, A., Teixeira, H., 2004. Nanoemulsões como Sistemas de Liberação para Fármacos Oftálmicos. *Acta Farm. Bonaer.* 23 (4), 558–566.
- GBIF.org, 2022. *Duguetia stelechantha* (Diels) R. E. Fr. (<https://www.gbif.org/pt/species/3157541/metrics>).
- Hellmann, M.A., Marchesan, E.D., Velasquez, L.G., 2018. Leishmaniose e plantas medicinais: uma revisão. *Arq. De. Ciências Da Saúde Da UNIPAR* 22 (3). <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v22i3.2018.6921>.
- Jesus, A.J., Laurenti, M.D., Silva, M.L., Lago, J.H.G., Passero, L.F.D., 2021. Leishmanicidal activity and ultrastructural changes of maslinic acid isolated from *Hyptidendron canum*. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/9970983>.
- Jürgens, A., Webber, A.C., Gottsberger, G., 2000. Floral scent compounds of Amazonian Annonaceae species pollinated by small beetles and thrips. *Phytochemistry* 55, 551–558. (www.elsevier.com/locate/phytochem).
- Kumar, P., Nagarajan, A., Uchil, P.D., 2018. Análise de Viabilidade Celular pelo Ensaio MTT. *Cold Spring Harb. Protoc.* 6.
- Leite, M.F., 2009. Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo extrato e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* para enxaguaratório bucal [Tese]. Universidade de São Paulo.
- Lias, S.G., Mikaia, A.I., Sparkman, O.D., Stein, S.E., & Zaikin, G., 2022, December 3. The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database: Simultaneous Control of Quality and Quantity. In Proceedings of the 45th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics. <https://www.nist.gov/publications/nistepanh-mass-spectral-databasesimultaneous-control-quality-and-quantity>. (<https://www.nist.gov/publications/nistepanh-mass-spectral-databasesimultaneous-control-quality-and-quantity>).
- Lima, A., da, S., Maciel, A.P., Mendonça, C., de, J.S., Costa Junior, L.M., 2017. Use of encapsulated carvacrol with yeast cell walls to control resistant strains of *Rhizopneumonella microplus* (Acari: Ixodidae). *Ind. Crops Prod.* 108, 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.037>.
- Lima, A.S., Fernandes, Y.M.L., Silva, C.R., Costa-Junior, L.M., Figueiredo, P.L.B., Monteiro, O.S., Maia, J.G.S., da Rocha, C.Q., 2022. Anthelmintic evaluation and essential oils composition of *Hyptis dilatata* Benth. and *Mesosphaerum suaveolens* Kunze from the Brazilian Amazon. *Acta Trop.* 228. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106321>.
- Lima, B.S.S., Esteves, B.B., Fialho-Júnior, L.C., de Oliveira Mendes, T.A., da Fonseca Pires, S., Chapeourouge, A., Perales, J., de Andrade, H.M., 2020. Study of the differentially abundant proteins among *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, and *L. infantum*. *PLoS One* 15 (10 October). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240612>.
- Lobão, A.Q., & Bazante, M.L., 2023. *Duguetia* in Flora e Funga do Brasil. (<https://flora.dobrasil.jbrj.gov.br/FB110353>).
- Lyra, L.P.S., 2019. Desenvolvimento de Nanoemulsão de geraniol e óleo essencial da palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e sua ação inibitória sobre linhagens de Cutibacterium acnes. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho.”
- Maia, D.S., Lopes, C.F., Saldanha, A.A., Silva, N.L., Sartori, A.L.B., Carollo, C.A., Sobral, M.G., Alves, S.N., Silva, D.B., Siqueira, J.M., 2020. Larvicidal effect from different Annonaceae species on *Culex quinquefasciatus*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 36983–36993. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08997-6> / Published.
- Maia, J.G.S., Andrade, E.H.A., Carreira, L.M.M., Oliveira, J., 2006. Essential oil composition from *duguetia* species (annonaceae). *J. Essent. Oil Res.* 18 (1), 60–63. <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699386>.
- Marino, C.J.M., 2018. Desenvolvimento e controle de qualidade de formulações emulsionadas contendo óleo de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.).
- Meneguetti, D.U., de, O., Lima, R.A., Macedo, S.R.A., Barros, N.B., Facundo, J.B., Militão, J.S.L.T., Nicolet, R., Facundo, V.A., 2015. Atualização plantas da amazônia brasileira com potencial leishmanicida in vitro. *Rev. Patol. Trop.* 44 (4), 359–374.
- Monteiro, J., Passero, L.F.D., Jesus, J.A., Laurenti, M.D., Lago, J.H.G., Soares, M.G., Batista, A.N.L., Batista, J.M., Sartorelli, P., 2022. Absolute Configuration and Antileishmanial Activity of (–)-Cyclocolorenone Isolated from *Duguetia lanceolata* (Annonaceae). *Curr. Top. Med. Chem.* 22 (19), 1626–1633. <https://doi.org/10.2174/1568026622666220707095718>.
- Mota, E.F., Rosario, D.M., Veiga, A.S.S., Brasil, D.D.S.B., Silveira, F.T., Dolabela, M.F., 2016. Biological activities of *Croton palanostigma* Klotzsch. *Pharmacogn. Mag.* 12 (45), S96–S101. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.176109>.
- Neto, R.N.M., Setúbal, R.F.B., Higinio, T.M.M.L., Brelaz-De-Castro, M.C.A., da Silva, L.C.N., dos Santos Aliança, A.S., 2019. Asteraceae plants as sources of compounds against leishmaniasis and chagas disease. *Front. Pharmacol.* 10 (MAY), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00477>.
- Neves, J.K.O., 2013. Desenvolvimento e caracterização de microemulsões antimicrobianas e anti-inflamatórias contendo óleo de copaíba (Copaifera multijuga).
- Nogueira, J.O., 2019. Ação antimicrobiana de diferentes terpenos e fenilpropanóides em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. [Dissertação]. Universidade Federal de Lavras.
- Oliveira, A.G., Scarpa, M.V., Correa, M.A., Flávia, L., Cera, R., Formariz, T.P., 2004. MICROEMULSÕES: ESTRUTURA E APLICAÇÕES COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS. *Quim. Nova* 27, 1.
- Pires, E.A.M., 2014. Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para a avaliação da qualidade de matérias-primas e microemulsões com atividade leishmanicida. Universidade Federal de Pernambuco.
- Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J.C., Barrett, M.P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., Pountain, A.W., Mwenechanya, R., & Papadopolou, B., 2017. December 14). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), pp. 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>.

- Rabelo, D. de M., Silva, J.R.A., Amaral, A.C.F., Bizzo, H.R., Bezerra, J. de A., Corrêa, R.F., Veiga Júnior, V.F., & Pinheiro, M.L., 2008. Atividade Leishmanicida, Composição e Citotoxicidade do Óleo Essencial das folhas de *Guatteria citriodora* Ducke (Annonaceae).
- Reis, A.S., Rios, C.E.P., Melo, L.P., Costa, G.C., Silva, L.A., Patrício, F.J.B., Amaral, F.M. M., Nascimento, F.R.F., 2012. Atividade leishmanicida in vitro de frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. *Rev. Ciênc. Saúde* 14 (2), 119–126.
- Ribeiro, L.P., Domingues, V.C., Gonçalves, G.L.P., Fernandes, J.B., Glória, E.M., Vendramim, J.D., 2020. Essential oil from *Duguetia lanceolata* St.-Hil. (Annonaceae): suppression of spoilers of stored-grain. *Food Biosci.* 36. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100653>.
- Rodrigues, A.C.B.C., Bomfim, L.M., Neves, S.P., Menezes, L.R.A., Dias, R.B., Soares, M.B. P., Prata, A.P.N., Rocha, C.A.G., Costa, E. v., Bezerra, D.P., 2015. Antitumor properties of the essential oil from the leaves of *Duguetia gardneriana*. *Planta Med.* 81 (10), 798–803. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1546130>.
- Romanelli, M.F., 2004. Avaliação da toxicidade aguda e crônica dos surfactantes dss e las submetidos à irradiação com feixes de elétrons.
- Sakiy, P.O., Amewu, R.K., Devine, R.N.O.A., Ismaila, E., Miller, W.A., Kwofie, S.K., 2021. The Search for Putative Hits in Combating Leishmaniasis: The Contributions of Natural Products Over the Last Decade. In: *Natural Products and Bioprospecting*, 11. Springer, pp. 489–544. <https://doi.org/10.1007/s13659-021-00311-2>.
- Santos, A.C., Nogueira, M.L., Oliveira, F.P., Costa, E. v., & Bezerra, D.P., 2022. Essential Oils of *Duguetia* Species A. St. Hill (Annonaceae): Chemical Diversity and Pharmacological Potential. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 5). MDPI. (<https://doi.org/10.3390/biom12050615>).
- SiBBR, 2022. *Duguetia stelechantha* in Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBR). (https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/vie/w/especie/duguetia_stelechantha).
- Silva, C.E.L., Oyama, J., Ferreira, F.B.P., Silva, M.P.P., Lordani, T.V.A., Silva, R.C.L., Monich, M.S.T., Teixeira, J.J. v., & Lonardoni, M.V.C., 2020. Effect of essential oils on *Leishmania amazonensis*: A systematic review. In *Parasitology* (Vol. 147, Issue 13, pp. 1392–1407). Cambridge University Press. (<https://doi.org/10.1017/S0031182020001304>).
- Silva, D.B., da, Tulli, E.C.O., Garcez, W.S., Nascimento, E.A., Siqueira, J.M. de, 2007. Chemical constituents of the underground stem bark of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* 18 (8), 1560–1565. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000800017>.
- Silva, J.A., Pereira De Santana, D., Galindo, D., Bedor, C., Ferreira Da Costa Borba, V., Amélia, A., Lira, M., 2009. ESTUDO DE LIBERAÇÃO E PERMEACÃO IN VITRO DO DICLOFENACO DE DIETILAMÔNIO EM MICROEMULSÃO GEL-LIKE. *Quim. Nova* 32, 6.
- Silva-Silva, J.V., 2016. *Estudos farmacognósticos, fitoquímicos e atividade antileishmania de espécies Geissospermum (Apocynaceae)*. [Dissertação]. Universidade Federal do Pará.
- Siqueira, J.M., Müller, L., Carollo, C.A., Garcez, W.S., Boaventura, M.A.D., Nascimento, E.A., 2003. Aromadendrane sesquiterpenoids from the essential oil of leaves of *Duguetia glabriuscula* - Annonaceae. *J. Chil. Chem. Soc.* 48 (4) <https://doi.org/10.4067/S0717-97072003000400014>.
- Tempone, A.G., Borborema, S.E.T., Andrade, H.F., Gualda, N.C.A., Yogi, Á., Carvalho, C. S., Bachiega, D., Lupo, F.N., Bonotto, S. v., Fischer, D.C.H., 2005. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine* 12 (5), 382–390. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.10.007>.
- Üstündağ Okur, N., Apaydin, Ş., Karabay Yavaşoğlu, N. Ü., Yavaşoğlu, A., & Karasulu, H. Y., 2011. Evaluation of skin permeation and anti-inflammatory and analgesic effects of new naproxen microemulsion formulations. *Int. J. Pharm.* 416 (1), 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.06.026>.
- Vidotto, C., Silva, D.B., Patussi, R., Fabrício, Luis, Brandão, G., Tibúrcio, J.D., Alves, Stênio N., Siqueira, João M. de, 2013. Brine shrimp lethality test as a biological model for preliminary selection of pediculicidal components from natural source. *Orig. Artic. Biosci. J.* 1, 255–263.
- WHO, 2023January 12). Leishmaniasis. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Leishmaniasis>. (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>).
- Zidom, C., 2019. Plant chemophenetics – a new term for plant chemosystematics/plant chemotaxonomy in the macro-molecular era. *Phytochemistry* 163, 147–148. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.02.013>.

Anexo B – Barata Lopes, Auxiliadora C.C.; Nascimento, Jessyane R.; Camara, Marcos B.P.; Lima, Aldilene S.; Lopes, Glaucia L.N.; do Nascimento, Matheus O.; Xavier, Júlia K.A.M.; de Jesus, Caroline M.; Mendonça, Cáritas d.J.S.; Carvalho, André L.M.; Silva, Lucilene A.; **Rocha, Cláudia Q.** Chemical Characterization, Leishmanicidal Activity and In Vitro Cytotoxicity of the Essential Oil Extracted from *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip. and Its Incorporation into Microemulsion Systems. *Pharmaceutics* 2024, 16, 87. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16010087>

Article

Chemical Characterization, Leishmanicidal Activity and In Vitro Cytotoxicity of the Essential Oil Extracted from *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip. and Its Incorporation into Microemulsion Systems

Auxiliadora Cristina Correa Barata Lopes ¹, Jessyane Rodrigues do Nascimento ², Marcos Bispo Pinheiro Camara ¹, Aldilene da Silva Lima ³, Gláucia Laís Nunes Lopes ⁴, Matheus Oliveira do Nascimento ⁴, Júlia Karla Albuquerque Melo Xavier ³, Caroline Martins de Jesus ⁵, Cáritas de Jesus Silva Mendonça ³, André Luis Menezes Carvalho ⁴, Lucilene Amorim Silva ⁶ and Cláudia Quintino da Rocha ^{1,3,*}

- ¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), Universidade Federal do Maranhão, São Luís 65080-805, MA, Brazil; auxiliadora.lopes@discente.ufma.br (A.C.C.B.L.); marcos.camara@discente.ufma.br (M.B.P.C.)
- ² Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara 14800-060, SP, Brazil; jessyane.nascimento@unesp.br
- ³ Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís 65080-805, MA, Brazil; aldilene.silva@ufma.br (A.d.S.L.); julia.xavier@icen.ufpa.br (J.K.A.M.X.); cjm.mendonca@ufma.br (C.d.J.S.M.)
- ⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina 64049-550, PI, Brazil; glaucialais@ufpi.edu.br (G.L.N.L.); matheusodn2@ufpi.edu.br (M.O.d.N.); aluismenezes@ufpi.edu.br (A.L.M.C.)
- ⁵ Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz 65900-410, MA, Brazil; caroline.mj@discente.ufma.br
- ⁶ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís 65080-805, MA, Brazil; lucilene.silva@ufma.br
- * Correspondence: rocha.claudia@ufma.br



Citation: Lopes, A.C.C.B.; do Nascimento, J.R.; Camara, M.B.P.; Lima, A.d.S.; Lopes, G.L.N.; do Nascimento, M.O.; Xavier, J.K.A.M.; de Jesus, C.M.; Mendonça, C.d.J.S.; Carvalho, A.L.M.; et al. Chemical Characterization, Leishmanicidal Activity and In Vitro Cytotoxicity of the Essential Oil Extracted from *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip. and Its Incorporation into Microemulsion Systems. *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 87. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16010087>

Academic Editor: Evgenia Mitsou

Received: 16 November 2023

Revised: 20 December 2023

Accepted: 5 January 2024

Published: 9 January 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip., known in Brazil as alecrim do campo, is a small Asteraceae family plant with a calming effect and consumed as tea. This species contains components, such as neral and geranial, that display various biological activities, such as leishmanicidal. The aim was to chemically characterize the essential oil (EO) obtained from *P. brevipedunculata* (EO-PB) by hydrodistillation and a microemulsion formulated with EO (ME-PB), Tween 80 and Transcutol P, assess the leishmanicidal effect against *Leishmania* (L.) *amazonensis* promastigotes and cytotoxicity against RAW 264.7. EO-PB and ME-PB were analyzed by Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS). Monoterpene hydrocarbons were noteworthy among the identified compounds. The main EO-PB constituents were α -pinene and limonene, followed by neral and geranial, which were maintained in ME-PB. EO-PB presented an inhibitory concentration (IC₅₀) of 20 μ g/mL and ME-PB of 0.93 μ g/mL. ME-PB inhibition towards the parasite was 20-fold higher than that of EO-PB. This indicated that EO incorporation to the microemulsion resulted in optimized biological activity. Selectivity indices indicate that ME-PB is more selective concerning parasite inhibition. Thus, ME-PB may comprise an adequate approach against *Leishmania*, as the inhibitory concentration (IC₅₀) promastigotes was lower than that considered toxic for cells cell cytotoxicity of 50% (CC₅₀).

Keywords: Asteraceae; formulation; *L. (L.) amazonensis*; monoterpenes; nanotechnology; promastigote

1. Introduction

Pectis brevipedunculata (Gardner) Sch.Bip., popularly known in Brazil as alecrim do campo, capim-santo, catinga-de-formiga, limãozinho and capim-limão [1–3], belongs to the Asteraceae family and *Pectis* L. genus [3]. This plant is distributed throughout some

Brazilian regions, namely in the states of Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia, Goiás, Brasília, Minas Gerais and Rio de Janeiro, and also distributed in other countries, such as Ecuador, Mexico and the United States [3,4].

Pectis brevipedunculata is a small plant displaying spontaneous occurrence in lawns and uncultivated fields [5]. One notable feature of this species is its leaf scent, reminiscent of lemongrass, which is known for its citrusy and lemon-like odor and is often used in culinary and medicinal applications. Regarding its chemical composition, the major *P. brevipedunculata* essential oil (EO) components are geranial and neral, which, together, represent about 51% of the plant's in natura oil. The third most prevalent component is α -pinene, ranging from 17 to 30%, followed by limonene, from 7 to 14% [6,7].

Identified as the main *P. brevipedunculata* component, citral (neral and geranial) is responsible for this plant's calming effect and is associated with its popular uses [8]. The literature also reports traditional citral uses for other *Pectis* genus species, such as against anxiety, hypertension, intestinal problems, colds, in flavoring, and as a nematicide, larvicide and antimicrobial agent [9,10]. This indicates that *Pectis* species display biotechnological potential and may be employed as a source of new drugs against diseases, such as leishmaniasis, a worldwide public health problem.

Tegumentary leishmaniasis is an infectious, non-contagious disease that is transmitted to humans during the blood meal of female sandflies (*Phlebotomus* and *Lutzomyia* genera) infected with *Leishmania* genus protozoa. This disease causes skin and mucous membrane ulcers in humans. Leishmania infection, however, does not confer immunity and affects 1 million people per year worldwide [11,12]. Leishmaniasis treatment comprises the administration of pentavalent antimonial drugs, amphotericin B and its liposomal formulation AmBisome, as well as Miltefosine, Paromomycin, and Pentamidine. But these drugs present certain limitations, such as parasite resistance and cases of toxicity toward human cells [13,14]. Thus, novel and effective methods of controlling the disease are required.

In this regard, natural products, especially terpenes, are examples of secondary metabolites that may be employed to combat leishmania. These compounds can be incorporated into certain formulations, such as microemulsions (ME), to intensify their effects. ME comprise thermodynamically stable isotropic and optically transparent nanometric systems formed by immiscible fluids, presenting both an aqueous phase and an oil phase stabilized by surfactants [15]. These formulations increase the bioavailability of active principles, optimize their biological activity and reduce compound toxicity, contributing to accelerating release speed and improving the clinical efficacy of drugs. In addition, they also increase nutrient, drug and cosmetic stability and optimize food conservation, among other properties [16].

Based on the above, this study aimed to chemically characterize the essential oil (EO-PB) obtained from *P. brevipedunculata* and a formulated microemulsion employing this oil (ME-PB) while also assessing leishmanicidal activity against *L. (Leishmania) amazonensis* promastigotes and cytotoxicity towards RAW 264.7 macrophages.

2. Materials and Methods

2.1. Collection of Plant Material

Aerial parts of *P. brevipedunculata* were collected on the campus of Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, MA, Brazil, coordinates: 2°33'20.5" S/44°18'32.7" W. A voucher specimen was deposited in the Herbarium Rosa Mochel (SLUI), Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), São Luís, MA, Brazil, under the No. 5287. The plant is registered in the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen) under number AAFB38B.

2.2. Essential Oil Extraction

EO-PB was extracted by hydrodistillation using the Clevenger system from 300 g of the plant sample dried for 48 h at room temperature. The oil was extracted for a period of

3 h, after which it was centrifuged and dried with anhydrous sodium sulfate P.A (ISOFAR, RJ, Brazil). Yield was calculated according to [17].

2.3. Oil Composition Analysis and Microemulsion

The analysis of OE-PB and ME-PB was performed by Headspace Gas Chromatography Mass Spectrometry using a gas chromatograph (GC-2010) coupled to a mass spectrometer (GCMS-QP2010 Plus) (Shimadzu, Kyoto, Japan). A DB-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) with a helium carrier gas flow rate at a linear velocity of 39.5 cm/s (1.0 mL/min) was used. The oven setting was 40–240 °C (10 °C/min). The injector and ion source temperatures were 260 °C and 200 °C, respectively. The following chromatographic conditions were used: sample volume of 50 µL of the EO-PB sample and 500 µL of the ME-PB. Syringe: 2.5 mL—HS. Incubation temperature: 85 °C. Incubation time: 5 min. Shaking speed: 250 rpm. Filling speed: 100 µL/s. Retention indices were calculated for all volatile components using a homologous series of C₈–C₂₀ n-alkanes (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to the linear equation of Van Den Dool and Kratz [18]. The components of the EO and ME were identified by comparison of their mass spectra (molecular mass and fragmentation pattern) with data stored in the Adams and NIST libraries [19,20].

2.4. Development of Microemulsion and Incorporation of Essential Oil

To develop the microemulsion, surfactants Tween 80 (Polissorbato 80, Êxodo Científica, São Paulo, Brazil) and Transcutol P (Diethylene glycol monoethyl ether, Êxodo Científica, São Paulo, Brazil) were used. ME-PB was formulated by mixing the surfactants at a 1:1 ratio under magnetic stirring (SolidSteel, Piracicaba, Brazil) for 2 min at room temperature [21]. Next, the oily phase, the essential oil, was titrated to the surfactants in proportions (weight/weight) 1:9; 2:8; 3:7; 4:6; 5:5; 6:4; 7:3; 8:2 and 9:1 under magnetic stirring for 3 min. For each proportion, distilled water was slowly titrated in quantities of 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8 and 9, with constant magnetic stirring for 10 min. The phase behavior of the pseudoternary system of the 81 formulations was monitored using a black background for virtual inspection [22]. The stability of the systems was verified after resting for 24 h at room temperature. Then, based on the changes in visual appearance recorded, the pseudoternary phase diagram was constructed, plotting the points in the Origin Pro 8.6 software (OriginLab Corporation, Northampton, EUA). The diagram highlights the regions of the Winsor Classification: WI (Winsor I, two-phase system formed by an oil phase in equilibrium with an emulsified phase); WII (Winsor II, two-phase system formed by an aqueous phase in equilibrium with an emulsified phase); WIII (Winsor III, three-phase system formed by an aqueous phase and an oil phase, intermediated by an emulsified phase); WIV (Winsor IV, single-phase system, the ME region); and a milky white liquid emulsion and cloudy system. From the analysis of the phase diagram, the ideal ME formulation was defined. The formulated ME was stored in a place protected from light, heat and humidity, and after 48 h [23], it was chemically and biologically characterized.

2.5. Physicochemical Characterization of the Microemulsion

The droplet size (z-average diameter) and polydispersity index (PDI) were measured by Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK) at 25 °C at a 90° angle. The observations were performed in triplicate following a proper dilution in a 1:100 proportion (v/v) in ultra-purified water. The surface charge of the droplets was evaluated by zeta potential in the same instrument [15]. The thermal stability of the ME was analyzed by freezing cycles, in which the sample was subjected to −5 °C ± 2 °C for 24 h in the refrigerator (Electrolux, São Paulo, Brazil), and thawing cycles at 50 °C ± 2 °C for 24 h in an oven (SolidSteel, Piracicaba, Brazil), in a total of 6 cycles for 12 days [24]. The ME was also characterized by density, pH and refractive index, before and after the thermal stability test at 25 °C [15].

2.6. Culture of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* N Promastigotes

Schneider's medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, São Paulo, Brazil) was used for parasite culture. Promastigotes of *L. (L.) amazonensis* (MHOM/Br/90/BA125) were in the stationary growth phase with flagellar motility. The culture was stored in a Biochemical Oxygen Demand (B.O.D) incubator (Labor, SP-500, São Paulo, Brazil) at 26 °C [25,26].

2.7. Leishmanicidal Activity

Leishmanicidal activity was verified by subjecting promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* (5×10^7 cells/mL) at concentrations varied, such as 8 concentrations for EO-PB (500 to 3.90 µg/mL), 11 for ME-PB (500 to 0.48 µg/mL), and 6 for ME-BLANCK (500 to 15.62 µg/mL), which were added into 96-well plates, containing a final volume of 100 µL. The test was carried out in triplicate, according to the methods of [26], with adaptations. The negative control consisted of the promastigote forms grown in Schneider's medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% FBS. The positive control was composed of the standard Pentamidine® (Sanofi aventis, Anagni, Italy) (IC₅₀: 4 µg/mL) on the parasite grown in the supplemented medium. A control of the medium and a diluent, 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) (ISOFAR, RJ, Brazil), was also performed with the cultured parasite. The viability of *L. (L.) amazonensis* promastigotes and *L. amazonensis* RAW 264.7 macrophages was evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide tetrazolium (MTT) colorimetric method. This test converts the water-soluble 3-(4,5-dimethyl-2-thiazole)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide salt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), which is yellow in color, into insoluble purple crystals of formazan. Conversion occurs in viable, metabolically active cells through the activity of the mitochondrial enzyme succinate tetrazolium reductase. Thus, it is possible to quantify living cells [27,28]. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated with the absorbance values obtained.

2.8. Cytotoxicity Assay on Macrophages

RAW 264.7 macrophage cell lines (2×10^6 cells/mL) cultured at 37 °C and 5% CO₂ were used in the in vitro cytotoxicity assay, and treated with varied concentrations, such as 8 concentrations for EO-PB (500 to 3.90 µg/mL), 11 for ME-PB (500 to 0.24 µg/mL), and 6 for ME-BLANCK (500 to 15.62 µg/mL) of ME-BLANK in a 96-well plate. The tests were performed in triplicate, according to the methodology of [29], with adaptations. The negative control consisted of cells and an RPMI (Roswell Park Memory Institute) medium (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) supplemented with 10% FBS. Positive control was assessed in cells with 0.5% DMSO and the medium used was also controlled. The plates were incubated for 48 h; after this period, the cells were analyzed by the MTT colorimetric method, and read in the microplate reader (BioTek Instruments, Vermont, EUA) at 540 nm. Cell cytotoxicity of 50% (CC₅₀) was measured with the absorbance values obtained.

2.9. MTT Assay

The MTT method was selected to verify the cell viability of *L. (L.) amazonensis* promastigotes and RAW macrophages. In the previous assays, after incubation, the plates were centrifuged, and the supernatant from the wells was removed and replaced with fresh medium containing MTT (5 mg/mL). The plates were then incubated at B.O.D. for 3 h; after this period, the plates were centrifuged again and the formazan crystals were dissolved in 100 µL of pure DMSO. The reading of the absorbances occurred in the microplate reader at 540 nm [30]. To finalize the study, the Selectivity Index (S.I.) was calculated by dividing CC₅₀ by IC₅₀. A result of S.I. greater than 1 means that the sample shows higher toxicity to the parasite. On the other hand, an S.I. lower than 1 means that the sample has higher toxicity to the cell. Thus, the higher the S.I., the more selective the sample to the parasite and less toxic to the cell [31].

2.10. Statistical Analysis

The software used for statistical analysis was GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). Data were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and differences between means were determined by Tukey's test ($p \leq 0.05$) in order to obtain the mean, IC_{50} and CC_{50} .

3. Results and Discussion

3.1. Oil and Microemulsion Compositions

The volatile compositions of EO-PB extracted from *P. brevipedunculata* and its ME-PB are displayed in Table 1. Thirty-five compounds were identified by GC-MS, comprising about 97.12% of the total oil composition. The identified chemical compounds are listed in detail, along with their retention times (RT), and Kovats indexes (KI) in Table 1. These EO-PB and ME-PB compounds can be categorized into four classes of components, including high percentages of monoterpene hydrocarbons (83.87%; 84.64%) and oxygenated monoterpenes (9.51%; 8.93%), minor concentrations of fatty acids and derivatives (3.70%, 4.67%) and sesquiterpene hydrocarbons (0.04%; 0.37%).

The main constituents of EO-PB and ME-PB were α -pinene (56.47%; 50.17%) and limonene (19.98%; 23.17%), followed by citral (7.24%; 8.12%), represented by the sum of two isomeric oxygenated monoterpenes, neral (3.78%; 4.22%) and geranial (3.46%; 3.90%) (Table 1; Figure 1). Citral (neral + geranial) is considered a chemical EO marker for several species belonging to the *Pectis* genus, such as *P. apodocephala*, *P. angustifolia*, *P. brevipedunculata*, *P. ciliaries*, *P. elongata*, *P. jangadensis* and *P. linifolia* [9].

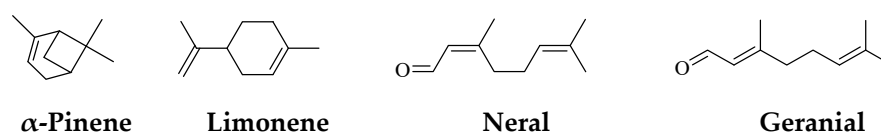


Figure 1. The main constituents of the essential oil (EO-PB) extracted from *Pectis brevipedunculata* and its micro-emulsion (ME-PB) employing the headspace method by Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry.

A recent study on the seasonal and circadian evaluation of the *P. brevipedunculata* EO extracted by hydrodistillation revealed citral (neral and geranial) percentages ranging between 49.8 and 76.4%, followed by α -pinene (7.2% to 19.8%) and limonene (5.3% to 9.4%), both present at lower concentrations [7]. The literature, however, reports that citral concentrations and the volatile profile of *P. brevipedunculata* may vary depending on the EO extraction method [32]. For example, the volatile composition of the *P. brevipedunculata* EO extracted by hydrodistillation contained citral (84.0%), neral (35.8%) and geranial (48.2%), followed by limonene (2.7%) and α -pinene (1.9%), while the EO extracted by headspace-solid phase microextraction method contained high percentages of the monoterpene α -pinene (17.3–25.5%) and limonene (10.0–11.0%), whereas geranial (2.8–10.9%) and neral (2.5–6.5%) were present at only minor concentrations [9].

Citral content variations have also been reported when altering plant drying temperatures. For example, EOs extracted at 40 °C and 60 °C from fresh and dry *P. brevipedunculata* specimens contained neral and geranial as their main constituents, followed by α -pinene and limonene. However, low geranial contents were detected in the EO from plant material dried at room temperature (29.7 °C), with a predominance of α -pinene and neral. This may be due to natural volatilization during long drying times at room temperature, generating EO constituent losses and degradation [6].

Table 1. Characterization of the essential oil (EO-PB) extracted from *Pectis brevipedunculata* and its microemulsion (ME-PB) employing the headspace method by Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry.

No.	RT ^a	KI ^b	Compound	Formula	EO-PB	ME-PB
					Area (%)	
1	6.685	855	(E)-2-hexenal	C ₆ H ₁₀ O	0.05	
2	6.740	853	(3Z)-hexenol	C ₆ H ₁₂ O	0.08	
3	8.270	926	tricyclene	C ₁₀ H ₁₆	0.11	0.12
4	8.385	930	α-thujene	C ₁₀ H ₁₆		0.86
5	8.605	939	α-pinene	C ₁₀ H ₁₆	56.47	50.17
6	8.895	959	camphene	C ₁₀ H ₁₆	0.59	0.67
7	9.355	975	sabinene	C ₁₀ H ₁₆	3.10	3.74
8	9.460	979	β-pinene	C ₁₀ H ₁₆	1.50	1.87
9	9.595	985	6-methyl-5-heptene-2-one	C ₈ H ₁₄ O	3.47	2.47
10	9.680	990	β-myrcene	C ₁₀ H ₁₆	1.28	2.05
11	9.755	991	6-methyl-5-hepten-2-ol	C ₈ H ₁₆ O	0.10	0.05
12	10.375	1024	p-cymene	C ₁₀ H ₁₄	0.12	
13	10.520	1029	limonene	C ₁₀ H ₁₆	19.98	23.17
14	10.555	1037	(Z)-β-ocimene	C ₁₀ H ₁₆	0.07	
15	10.760	1050	(E)-β-ocimene	C ₁₀ H ₁₆	0.65	1.84
16	10.985	1059	γ-terpinene	C ₁₀ H ₁₆		0.10
17	11.215	1072	cis-linalool oxide (furanoid)	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0.08	
18	11.470	1088	p-mentha-2,4(8)-diene	C ₁₀ H ₁₆		0.08
19	11.550	1370	octylcyclopropane	C ₁₁ H ₂₂		1.94
20	11.705	1140	cis-β-terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.26	0.19
21	11.740	1159	α-pinene oxide	C ₁₀ H ₁₆ O	0.63	
22	12.425	1144	exo-isocitral	C ₁₀ H ₁₆ O	0.04	0.07
23	12.295	1136	cis-limonene oxide (Me vs. IPP)	C ₁₀ H ₁₆ O	0.13	
24	12.360	1142	trans-limonene oxide	C ₁₀ H ₁₆ O	0.06	
25	12.715	1144	trans-verbenol	C ₁₀ H ₁₆ O	0.16	
26	13.015	1144	(E)-isocitral	C ₁₀ H ₁₆ O	0.22	
27	13.720	1229	nerol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.22	0.18
28	13.950	1238	neral	C ₁₀ H ₁₆ O	3.78	4.22
29	14.090	1252	geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.47	0.29
30	14.385	1267	geranial	C ₁₀ H ₁₆ O	3.46	3.90
31	14.695	1370	n-undecanol	C ₁₁ H ₂₄ O		0.21
32	15.920	1375	α-ylangene	C ₁₅ H ₂₄		0.05
33	16.140	1390	β-elemene	C ₁₅ H ₂₄	0.04	0.11
34	16.610	1408	(E)-caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄		0.12
35	17.085	1454	α-humulene	C ₁₅ H ₂₄		0.09
Monoterpene Hydrocarbons					83.87	84.64
Oxygenated Monoterpenes					9.51	8.93
Sesquiterpene Hydrocarbons					0.04	0.37
Fatty acids and Derivatives					3.70	4.67
Total Identified					97.12	98.61

^a RT: Retention Times, ^b KI: Kovats retention index.

3.2. Physicochemical Essential Oil Characterization

EO-PB was characterized concerning yield, density, pH and refractive index. Plant sample moisture contents were also verified after 48 h of collection, immediately before EO-PB extraction. Moisture was determined to be 10.84%, similar to literature reports of about 10% w.b. (wet basis) [6]. In accordance with pharmacopoeias, the recommended maximum plant moisture content is between 8 and 14% [33].

The EO-PB yield extracted from 300 g of aerial *P. brevipedunculata* parts was 0.67%; this percentage was higher compared to specimens reported in other studies, such as aerial parts like leaves, branches, flowers and seeds (0.17%) [34], as well as the EO obtained from leaves and floral portions (0.36%) [6]. A seasonal study of the EO extracted from *P. brevipedunculata* reported higher contents in January and May (2.1%) and lower in February and September (1.1%) [7].

EO-PB density was established to be 0.87 g/mL, in accordance with the established parameters that characterize EOs as ranging from 0.69 to 1.11 g/mL [35]. The refractive index of the investigated EO-PB was 1.44. The EO-PB hydrogen ion potential was 6.00.

3.3. Development of Microemulsion and Incorporation of Essential Oil

The systems resulting from the 81 formulations developed with different surfactant: oil: water ratios gave rise to specific regions in the phase diagram (Figure 2), which are the regions of the Winsor Classification: WI (Winsor I, two-phase system formed by an oil phase in equilibrium with an emulsified phase); WII (Winsor II, two-phase system formed by an aqueous phase in equilibrium with an emulsified phase); WIII (Winsor III, three-phase system formed by an aqueous phase and an oil phase, intermediated by an emulsified phase); WIV (Winsor IV, single-phase system); and milky white liquid emulsion and cloudy system (Figure 3).

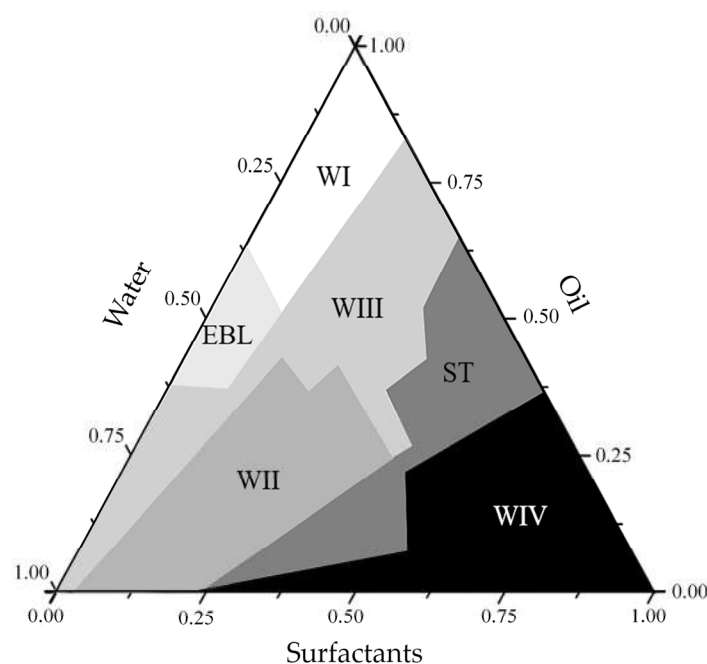


Figure 2. Phase diagram with Winsor Classification (1948): WI (Winsor I, two-phase system formed by an oil phase in equilibrium with an emulsified phase); WII (Winsor II, two-phase system formed by an aqueous phase in equilibrium with an emulsified phase); WIII (Winsor III, three-phase system formed by an aqueous phase and an oil phase, intermediated by an emulsified phase); WIV (Winsor IV, single-phase system, the microemulsion region); EBL (Milky white liquid emulsion); ST (Turbid system).

The single-phase, liquid, optically transparent and stable systems were identified as microemulsions and are allocated in the WIV region of the diagram. From this region of the phase diagram, a total of 18 MEs were obtained, 9 MEs from formulations with a 9:1 ratio, 5 MEs with an 8:2 ratio and 4 MEs with a 7:3 ratio. The selected ME ratio was 7:3:4, which contains the composition presented in Table 2, with the EO incorporated into the system at a concentration of 20%.



Figure 3. Representation of Winsor Classification (1948). (A) (Winsor I, two-phase system formed by an oil phase in equilibrium with an emulsified phase); (B) (Winsor II, two-phase system formed by an aqueous phase in equilibrium with an emulsified phase); (C) (Winsor III, three-phase system formed by an aqueous phase and an oil phase, intermediated by an emulsified phase); (D) (Winsor IV, single-phase system, the microemulsion region); (E) (Milky white liquid emulsion); (F) (Turbid system).

Table 2. Composition of the microemulsion formulated with *Pectis brevipedunculata* essential oil.

Component	Function	Proportion
Tween 80	Surfactant	26.7%
Transcutol P	Co-surfactant	26.7%
EO-PB	Oil phase	20.0%
Distilled water	Aqueous phase	26.6%

3.4. Physicochemical Microemulsion Characterization

The microemulsion investigated herein is of the oil/water (O/W) type, consisting of oil droplets dispersed in water and a surfactant at the oil/water interface. This ME category enables compound solubilization and has been employed to achieve higher drug stability, solubility, and bioavailability [36]. ME appearance was visually verified, comprising a transparent, clear, homogeneous system with only one phase, stable up to after 48 h of formulation. After this period, ME-PB was assessed concerning droplet size, polydispersion index, and zeta potential (Table 3).

Table 3. Characterization of the microemulsion formulated using the essential oil extracted from *Pectis brevipedunculata* (ME-PB).

Formulation	Droplet Size (nm)	Polydispersion Index	Zeta Potential (mV)
ME-PB	64.75 ± 22.24	0.37 ± 0.18	−12.9
ME-BLANK	17.18 ± 8.43	0.35 ± 0.07	−25

The nanometric size of ME-PB droplets was 64.75 nm while ME-BLANK droplets were 17.18 nm in size, both in line with what is predicted in the literature concerning particle size, ranging between 10 and 100 nm [37–39]. The polydispersion index (PDI) of ME-PB was 0.37 and of ME-BLANK, 0.35, also in accordance with recommended values lower than 0.5, indicating high homogeneity [40]. The verified zeta potentials were −12.9 mV for ME-PB and −25 mV for ME-BLANK. This parameter is associated to particle surface potential and can be negative or positive, depending on the nature of the formulation components (oil and surfactants) [41]. ME-PB was characterized before and after a thermal stability test (Table S1), presenting the same visual characteristics and remaining stable after the test.

A small density variation was verified for ME-PB following heat treatment, decreasing from 0.99 to 0.98 g/mL, while ME-BLANK density increased from 1.00 to 1.02 g/mL.

Neither was, however, statistically different and both are by the literature, i.e., microemulsions made with Rosemary, Oregano and Cinnamon EOs exhibited densities of 0.98 to 1.02 g/mL [42].

The pH of ME-PB was 7.09, decreasing significantly to 5.46 following the thermal stability test. The same was noted for ME-BLANK, which decreased from 6.81 to 6.46, albeit non-significantly. Higher aqueous phase contents in oil/water (O/W) ME lead to organic matter ionization, resulting in acidic pH values [15]. The observed pH decrease may be caused by the hydrolysis of system components, such as surfactants and oil phase compounds, or temperature increases [43]. Although parameter variations were noted following the thermal stability test, the pH values were still within the 5.5 to 8.0 range defined as that of greater physicochemical formulation stability [44]. The refractive indices of both ME-PB and ME-BLANK were not altered after the thermal stability test (Table S1).

3.5. Leishmanicidal Activity against *L. (Leishmania) amazonensis*

EO-PB displayed leishmanicidal activity against *L. (L.) amazonensis* promastigotes, with an IC_{50} of 20 $\mu\text{g/mL}$, while ME-PB was of 0.93 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 4). This indicated about 20-fold higher ME-PB activity compared to EO-PB. ME-PB was also more efficient compared to Pentamidine®, a standard drug used as a positive control (IC_{50} : 4 $\mu\text{g/mL}$). On the other hand, ME-BLANK exhibited an IC_{50} of 185.6 $\mu\text{g/mL}$ (Figure S1).

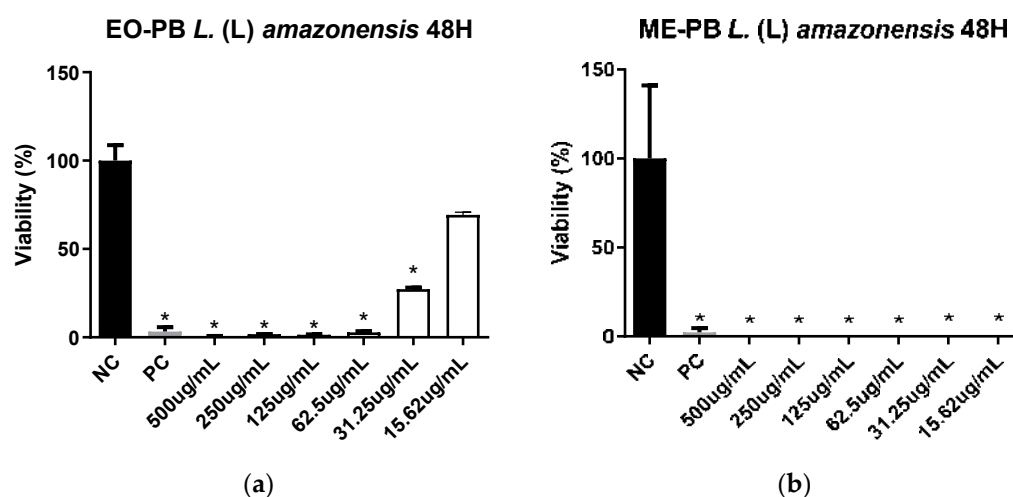


Figure 4. Viability of *L. (L.) amazonensis* promastigotes treated for 48 h with essential oil extracted from *P. brevipedunculata* (a) and its microemulsion (b). NC = negative control; PC = positive control; * Asterisks indicate statistically significant differences about the negative control at $p < 0.05$.

The α -pinene standard, which is one of the major compounds in EO-PB, was also tested and presented an IC_{50} of 64.78 $\mu\text{g/mL}$. This information was reported in [45], an additional study conducted by our research group. Samples with IC_{50} values equal to or less than 100 $\mu\text{g/mL}$ were defined as active, while samples ranging between 101 and 200 $\mu\text{g/mL}$ were categorized as moderately active, and those over 200 $\mu\text{g/mL}$ were perceived as inactive [46]. Considering this, the EO-PB, the ME-PB and the α -pinene standards investigated herein were configured as active samples, and the ME-BLANK standard was classified as moderately active.

The IC_{50} value of the ME vehicle (ME-BLANK) was higher than that of both EO-PB and ME-PB, indicating that the surfactants employed in the microemulsifying system were not responsible for parasite inhibition and that the observed leishmanicidal ME-PB activity is actually due to active EO principles that become more bioavailable when incorporated into the ME formulation. Active principles effective against *Leishmania amazonensis* as present in *P. brevipedunculata* have also been identified in the EO of several species belonging to different Asteraceae genera. These include *Vanillosmopsis arborea* EO, with an IC_{50} of 7.35 $\mu\text{g/mL}$, active against promastigotes [47], oils extracted from *Achillea millefolium* (IC_{50} :

7.8 µg/mL, leaves and flowers), *Matricaria recutita* (IC₅₀: 10.8 µg/mL, flower), *Pluchea carolinensis* (IC₅₀: 24.7 µg/mL); *Vernonia brasiliensis* (IC₅₀: 213 µg/mL, leaves; 112 µg/mL; flowers; 109 µg/mL, root) [48].

Secondary metabolites, such as terpenes, exhibit a mechanism of action that alters organelles, such as the nucleus and mitochondria, interacting and modifying the parasite cell membrane composition and permeability, causing nutrient dysregulation and cell division, potentially leading to cell death [49,50].

3.6. Cytotoxicity towards RAW 264.7 Macrophages

The CC₅₀ values of EO-PB, ME-PB and ME-BLANK towards RAW 264.7 macrophages were established as 6.13 µg/mL, 1.33 µg/mL and 62.65 µg/mL, respectively (Figures 5 and S2). Samples with CC₅₀ equal to or less than 100 µg/mL were defined as cytotoxic [31]. Thus, the EO-PB, ME-PB and ME-BLANK samples investigated showed potential cytotoxic against the tested cell line.

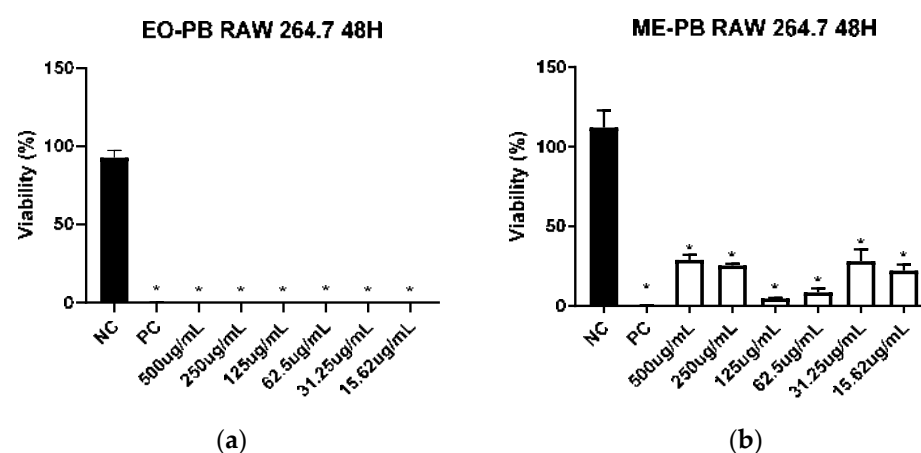


Figure 5. Cytotoxic activity of the essential oil (a) and microemulsion (b) extracted from *P. brevipedunculata* exerted towards the RAW 264.7 macrophage strain treated for 48 h. NC = negative control; PC = positive control; * Asterisks indicate statistically significant differences in relation to the negative control at $p < 0.05$.

The Selectivity Index (S.I) was determined based on the cytotoxicity results towards RAW 264.7 cells and IC₅₀ against *L. (L.) amazonensis*. This index represents the highest sample toxicity or selectivity against parasites or cell lineages [31].

The value of S.I. from EO-PB showed a value lower than 1 (0.30) and the IC₅₀ for *L. (L.) amazonensis* was higher than that of the CC₅₀ (Table 4). This indicates that the investigated EO-PB is more toxic for the investigated cell line compared to the parasite, demonstrating cell disruption selectivity. On the other hand, the ME-PB S.I was higher than 1 (1.43), demonstrating that the assessed ME is more selective for parasite inhibition and less toxic to cells. This confirms the use of formulated ME against *Leishmania*, as the IC₅₀ for this protozoan was lower than the CC₅₀ (Table 4). ME-BLANK also exhibited an S.I of less than 1 (0.34), similar to EO-PB, resulting in higher cell toxicity against *L. (L.) amazonensis*.

The observed toxicities of both EO-PB and ME-PB for cells investigated were, in fact, predicted. The volatile composition of EOs and the surfactants used in ME formulations can alter microorganism cytoplasmic membrane structures and compositions, modifying their permeability and potentially lead to cell rupture [51]. Based on the results explained, OE-PB, when incorporated into a ME system, is safe for use against protozoan *Leishmania*, as it potentializes the toxicity against the parasite, requiring a lower concentration of ME to inhibit the same amount that would be inhibited by the action of pure OE. This result is obtained because the ME enhances the effects of active ingredients, optimizing their leishmanicidal biological activity.

Table 4. Inhibitory concentration (IC₅₀), cytotoxic concentrations (CC₅₀) and Selectivity Index (S.I.) values of the essential oil extracted from *Pectis brevipedunculata* (EO-PB), its microemulsion (ME-PB) and the vehicle (ME-BLANK) against *L. (L.) amazonensis* promastigotes and the 264.7 RAW macrophage strain.

Samples	Promastigote IC ₅₀ (µg/mL)	Macrophages RAW 264.7 CC ₅₀ (µg/mL)	S.I.
EO-PB	20	6.13	0.30
ME-PB	0.93	1.33	1.43
ME-BLANK	185.6	62.65	0.34

4. Conclusions

The action of active compounds extracted from *P. brevipedunculata* is significantly enhanced in the microemulsion system developed in this study. This system demonstrates a remarkable 20-fold increase in cytotoxicity against *L. (L.) amazonensis* promastigotes compared to the essential oil (EO) itself. This innovation may offer a viable substitute for existing drugs used in the treatment of leishmaniasis, which have their limitations, including toxicity to human cells and the development of parasite resistance. In this way, the developed microemulsion represents a significant advancement in harnessing the therapeutic potential of natural plant products for drug development.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics16010087/s1>, Table S1. Characterization of the microemulsion formulated using the essential oil extracted from *Pectis brevipedunculata* (ME-PB) before and after thermal stability test; Figure S1. Viability of *L. (L.) amazonensis* promastigotes treated for 48 h the microemulsion blank. NC = negative control; PC = positive control; * Asterisks indicate statistically significant differences in relation to the negative control at $p < 0.05$; Figure S2. Cytotoxic activity of the microemulsion blank exerted towards the RAW 264.7 macrophage strain treated for 48 h. NC = negative control; PC = positive control; * Asterisks indicate statistically significant differences in relation to the negative control at $p < 0.05$.

Author Contributions: Conceptualization, A.C.C.B.L., A.d.S.L., L.A.S. and C.Q.d.R.; methodology, A.C.C.B.L., J.R.d.N., M.B.P.C., M.O.d.N., J.K.A.M.X., C.M.d.J., C.d.J.S.M., A.L.M.C. and C.Q.d.R.; software, A.C.C.B.L.; validation, A.C.C.B.L., J.R.d.N., G.L.N.L., M.B.P.C., M.O.d.N., J.K.A.M.X., C.M.d.J., A.L.M.C. and C.Q.d.R.; formal analysis, A.C.C.B.L., J.K.A.M.X. and C.Q.d.R.; investigation, A.C.C.B.L., J.R.d.N., A.d.S.L., M.B.P.C., M.O.d.N., J.K.A.M.X., C.M.d.J., C.d.J.S.M., A.L.M.C., L.A.S. and C.Q.d.R.; resources, L.A.S. and C.Q.d.R.; data curation, A.C.C.B.L. and C.Q.d.R.; writing—original draft preparation, A.C.C.B.L., J.R.d.N., J.K.A.M.X., C.M.d.J. and C.Q.d.R.; writing—review and editing, A.C.C.B.L., A.d.S.L., L.A.S. and C.Q.d.R.; visualization, A.C.C.B.L. and C.Q.d.R.; supervision, C.Q.d.R. and L.A.S.; project administration, C.Q.d.R.; funding acquisition, C.Q.d.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001, PROCAD-AM [88887.472618/2019-00 (C.Q.d.R)], FAPEMA [(Proc.: INFRA-02263/21 (C.Q.d.R))] and CAPES/PDPG-POSDOC/Programa de Desenvolvimento da Pós-Graduação (PDPG) Pós-Doutorado Estratégico [88881.691482/2022-01 (C.Q.d.R)].

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article and Supplementary Materials.

Acknowledgments: To the Laboratory of Advanced Materials (LIMAv) of the Federal University of Piauí (UFPI) for the partnership in carrying out the analyses.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Vásquez, S.P.F.; Mendonça, M.S.; Noda, S.d.N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. *Acta Amaz.* **2014**, *44*, 457–472. [CrossRef]
2. Magalhães, K.N.; Bandeira, M.A.M.; Monteiro, M.P. *Plantas Medicinais da Caatinga do Nordeste Brasileiro [Livro Eletrônico]: Etnofarmacopeia do Professor Francisco José de Abreu Matos*; Imprensa Universitária: Fortaleza, Brazil, 2020; pp. 1–250.
3. GBIF. *Pectis Brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip. Available online: <https://www.gbif.org/pt/species/5405460> (accessed on 1 May 2023).
4. Catalogue of Life. *Pectis Brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip. Available online: <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/75xf6> (accessed on 1 June 2023).
5. Mendonça, C.B.F.; Esteves, V.G.; Esteves, R.L. Palinologia de espécies de Asteroideae (Compositae) ocorrentes na restinga de Carapebus, Carapebus, Rio de Janeiro. *Hoehnea* **2002**, *29*, 233–240.
6. Oliveira, M.T.R.; Berbert, P.A.; Matos, C.R.R.; Mathias, L.; Moreira, R.O. Efeito da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Pectis brevipedunculata*. *Quim. Nova* **2011**, *34*, 1200–1204. [CrossRef]
7. Camara, M.; Lima, A.; Jumbo, L.; Tavares, C.; Mendonça, C.; Monteiro, O.; Araújo, S.; Oliveira, E.; Neto, J.; Maia, J.; et al. Seasonal and Circadian Evaluation of the *Pectis brevipedunculata* Essential Oil and Its Acaricidal Activity against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Braz. Chem. Soc.* **2023**, *34*, 1020–1029. [CrossRef]
8. Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. *Plantas Medicinais No Brasil: Nativas e Exóticas*, 3rd ed.; Instituto Plantarum: Nova Odessa, Brazil, 2002; pp. 1–542.
9. Marques, A.M.; Lima, C.H.P.; Alviano, D.S.; Alviano, C.S.; Esteves, R.L.; Kaplan, M.A.C. Traditional use, chemical composition and antimicrobial activity of *Pectis brevipedunculata* essential oil: A correlated lemongrass species in Brazil. *Emir. J. Food Agric* **2013**, *25*, 798–808. [CrossRef]
10. Albuquerque, M.R.J.R.; Costa, S.M.O.; Bandeira, P.N.; Santiago, G.M.P.; Andrade-neto, M.; Silveira, E.R.; Pessoa, O.D.L. Nematicidal and larvicidal activities of the essential oils from aerial parts of *Pectis oligocephala* and *Pectis apodocephala* Baker. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **2007**, *79*, 209–213. [CrossRef]
11. Brazil. Leishmaniose Tegumentar (LT). Available online: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt> (accessed on 1 June 2023).
12. WHO. Leishmaniasis. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (accessed on 5 June 2023).
13. Neto, R.N.M.; Setúbal, R.F.B.; Higino, T.M.M.I.; Brelaz-De-Castro, M.C.A.; Silva, L.C.N.; Santos Aliança, A.S. Asteraceae plants as sources of compounds against leishmaniasis and chagas disease. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 477. [CrossRef]
14. Ponte-Sucre, A.; Gamarro, F.; Dujardin, J.C.; Barrett, M.P.; López-Vélez, R.; García-Hernández, R.; Pountain, A.W.; Mwenechanya, R.; Papadopolou, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0006052. [CrossRef]
15. Ciríaco, S.L.; Carvalho, I.P.S.; Terceiro Neto, J.A.; Lima Neto, J.S.; Oliveira, D.H.B.; Cunha, A.P.G.P.; Cavalcante, Y.T.D.; Silva, D.T.C.; Silva, J.A.; Mineiro, A.L.B.B.; et al. Development of microemulsion of tamsulosin and dutasteride for benign prostatic hyperplasia therapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2020**, *185*, 110573. [CrossRef]
16. Silva, J.D.F.; Silva, Y.P.; Piatnicki, C.M.S.; Böckel, W.J.; Mendonça, C.R.B. Microemulsões: Componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. *Quim. Nova* **2015**, *38*, 1196–1206. [CrossRef]
17. Lima, A.S.; Fernandes, Y.M.L.; Silva, C.R.; Costa-Junior, L.M.; Figueiredo, P.L.B.; Monteiro, O.S.; Maia, J.G.S.; Rocha, C.Q. Anthelmintic evaluation and essential oils composition of *Hyptis dilatata* Benth. and *Mesosphaerum suaveolens* Kuntze from the Brazilian Amazon. *Acta Trop.* **2022**, *228*, 106321. [CrossRef] [PubMed]
18. Van Den Dool, H.; Kratz, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—Liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* **1963**, *11*, 463–471. [CrossRef] [PubMed]
19. Adams, R.P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed.; Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA, 2007.
20. Lias, S.G.; Mikala, A.I.; Sparkman, O.D.; Stein, S.E.; Zaikin, G. The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database: Simultaneous Control of Quality and Quantity. In Proceedings of the 45th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Minneapolis, MN, USA, 9 June 2022; Available online: <https://www.nist.gov/publications/nistepanib-mass-spectral-database-simultaneous-control-quality-and-quantity> (accessed on 1 May 2023).
21. Nascimento, J.R.; Lira, B.S.M.M.; Nascimento, M.O.; Lopes, G.L.N.; Ferreira, G.M.; Nunes, G.C.S.; Gonçalves, R.S.; Carvalho, A.L.M.; Vilegas, W.; Rocha, C.Q. Innovative Microemulsion Loaded with Unusual Dimeric Flavonoids from *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann Roots. *AAPS PharmSciTech* **2023**, *24*, 212. [CrossRef] [PubMed]
22. Silva, J.A.; Dasmaceno, B.P.G.L.; Borba, V.F.C.; Egito, E.S.T.; Santana, D.P. Uso de diagramas de fase pseudoternários como ferramenta de obtenção de nanoemulsões transdérmicas. *Rev. Bras. Far.* **2009**, *90*, 245–249.
23. Silva, J.A.; Bedor, R.D.C.G.L.; Oliveira, A.G.; Egito, E.S.T.; Santana, D.P. Physicochemical characterization and desenvolvimento of a microemulsion system for transdermal use. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2009**, *31*, 1–8. [CrossRef]

24. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos*, 1st ed.; ANVISA: Brasília, Brazil, 2004; pp. 1–52.
25. Bezerra, J.L.; Costa, G.C.; Lopes, T.C.; Carvalho, I.C.D.S.; Patrício, F.J.; Sousa, S.M.; Amaral, F.M.M.; Manuel, J.; Rebelo, M.; Guerra, R.N.M.; et al. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. *Rev. Bras. Farm.* **2006**, *16*, 631–637. [\[CrossRef\]](#)
26. Reis, A.S.; Rios, C.E.P.; Melo, L.P.; Costa, G.C.; Silva, L.A.; Patrício, F.J.B.; Amaral, F.M.M.; Nascimento, F.R.F. Atividade leishmanicida in vitro de frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. *Rev. Ciênc. Saúde* **2012**, *14*, 119–126.
27. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63. [\[CrossRef\]](#)
28. Stockert, J.C.; Horobin, R.W.; Colombo, L.L.; Blázquez-Castro, A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem.* **2018**, *120*, 159–167. [\[CrossRef\]](#)
29. Tempone, A.G.; Borborema, S.E.T.; Andrade, H.F.; Gualda, N.C.A.; Yogi, Á.; Carvalho, C.S.; Bachiega, D.; Lupo, F.N.; Bonotto, S.V.; Fischer, D.C.H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine* **2005**, *12*, 382–390. [\[CrossRef\]](#)
30. Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P.D. Análise de Viabilidade Celular pelo Ensaio MTT. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**, *6*, 469–471. [\[CrossRef\]](#)
31. Silva-Silva, J.V. Estudos Farmacognósticos, Fitoquímicos e Atividade Antileishmania de Espécies Geissospermum (Apocynaceae). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Master's Thesis, Universidade Federal do Pará, Pará, Brazil, 2016.
32. Marques, A.M.; Kaplan, M.A.C. Preparative isolation and characterization of monoterpene isomers present in the citral-rich essential oil of *Pectis brevipedunculata*. *J. Essent. Oil Res.* **2013**, *25*, 210–215. [\[CrossRef\]](#)
33. Farias, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*, 6th ed.; Simões, C.M.O., Ed.; Editora da UFRGS: Rio Grande do Sul, Brazil, 2007; pp. 1–1097.
34. Leal, R.H. Prospecção de Plantas Aromáticas na Região do Médio e Baixo Solimões. Programa de Pós-Graduação em Química. Master's Thesis, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, Brazil, 2010.
35. Simões, C.M.O.; Spitzer, V. Óleos Voláteis. In *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*, 6th ed.; Simões, C.M.O., Ed.; Editora da UFRGS: Rio Grande do Sul, Brazil, 2007; pp. 1–1097.
36. Oliveira, A.G.; Scarpa, M.V.; Correa, M.A.; Luciane, F.R.C.; Formariz, T.P. Microemulsões: Estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Quim. Nova* **2004**, *27*, 131–138. [\[CrossRef\]](#)
37. Muzaffar, F.; Singh, U.K.; Chauhan, L. Review on microemulsion as futuristic drug delivery. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2013**, *5*, 39–53.
38. Gupta, A.; Eral, H.B.; Hatton, T.A.; Doyle, P.S. Nanoemulsions: Formation, properties and applications. *Soft Matter* **2016**, *12*, 2826–2841. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Tartaro, G.; Mateos, H.; Schirone, D.; Angelico, R.; Palazzo, G. Microemulsion microstructure(s): A tutorial review. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1657. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Üstündağ Okur, N.; Apaydin, Ş.; Karabay Yavaşoğlu, N.Ü.; Yavaşoğlu, A.; Karasulu, H.Y. Evaluation of skin permeation and anti-inflammatory and analgesic effects of new naproxen microemulsion formulations. *Int. J. Pharm.* **2011**, *416*, 136–144. [\[CrossRef\]](#)
41. Külkamp, I.C.; Paese, K.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. *Quim. Nova* **2009**, *32*, 2078–2084. [\[CrossRef\]](#)
42. Dávila-Rodríguez, M.; López-Malo, A.; Palou, E.; Ramírez-Corona, N.; Jiménez-Munguía, M.T. Essential oils microemulsions prepared with high-frequency ultrasound: Physical properties and antimicrobial activity. *J. Food Sci. Technol.* **2020**, *57*, 4133–4142. [\[CrossRef\]](#)
43. Bruxel, F.; Laux, M.; Wild, L.B.; Fraga, M.; Koester, L.S.; Teixeira, H.F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parental de fármacos. *Quim. Nova* **2012**, *35*, 1827–2840. [\[CrossRef\]](#)
44. Fronza, T.; Campos, A.; Teixeira, H. Nanoemulsões como Sistemas de Liberação para Fármacos Oftálmicos. *Acta Farm. Bonaer.* **2004**, *23*, 558–566.
45. Lopes, A.C.C.B.; Camara, M.B.P.; Lima, A.S.; Nascimento, M.O.; Xavier, J.K.A.M.; Jesus, C.M.; Mendonça, C.J.S.; Carvalho, A.L.M.; Silva, L.A.; Rocha, C.Q. Chemical composition and potential antileishmanial and cytotoxic activity of *Duguetia stelechantha* (Diels) R.E.Fr. essential oil. *Ind. Crops Prod.* **2023**, *202*, 116978. [\[CrossRef\]](#)
46. Mota, E.F.; Rosario, D.M.; Veiga, A.S.S.; Brasil, D.D.S.B.; Silveira, F.T.; Dolabela, M.F. Biological activities of *Croton palanostigma* Klotzsch. *Pharmacogn. Mag.* **2016**, *12*, S96–S101. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Colares, A.V.; Almeida-Souza, F.; Taniwaki, N.N.; Souza, C.D.S.F.; Costa, J.G.M.; Calabrese, K.D.S.; Abreu-Silva, A.L. In vitro antileishmanial activity of essential oil of *Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae) baker. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*, 727042. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Silva, C.E.D.L.; Oyama, J.; Ferreira, F.B.P.; Silva, M.P.D.P.; Lordani, T.V.A.; Silva, R.C.D.L.; Monich, M.D.S.T.; Teixeira, J.J.V.; Lonardoni, M.V.C. Effect of essential oils on *Leishmania amazonensis*: A systematic review. *Parasitology* **2020**, *147*, 1392–1407. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Sakyi, P.O.; Amewu, R.K.; Devine, R.N.O.A.; Ismaila, E.; Miller, W.A.; Kwofie, S.K. The Search for Putative Hits in Combating Leishmaniasis: The Contributions of Natural Products Over the Last Decade. *Nat. Prod. Bioprospect.* **2021**, *11*, 489–544. [\[CrossRef\]](#)

50. Hellmann, M.A.; Marchesan, E.D.; Velasquez, L.G. Leishmaniose e plantas medicinais: Uma revisão. *Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR* **2018**, *22*, 217–231. [[CrossRef](#)]
51. Hammer, K.A.; Carson, C.F.; Riley, T.V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **2000**, *38*, 355–362. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Anexo C - Produções científicas desenvolvidas durante o Doutorado, a respeito do objeto de estudo e de outros temas relacionados à esta pesquisa.

Article

Chemical Characterization, Leishmanicidal Activity and In Vitro Cytotoxicity of the Essential Oil Extracted from *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip. and Its Incorporation into Microemulsion Systems

Auxiliadora Cristina Correa Barata Lopes ¹, Jessyane Rodrigues do Nascimento ², Marcos Bispo Pinheiro Camara ¹, Aldilene da Silva Lima ³, Gláucia Laís Nunes Lopes ⁴, Matheus Oliveira do Nascimento ⁴, Júlia Karla Albuquerque Melo Xavier ³, Caroline Martins de Jesus ⁵, Cáritas de Jesus Silva Mendonça ³, André Luis Menezes Carvalho ⁴, Lucilene Amorim Silva ⁶ and Cláudia Quintino da Rocha ^{1,3,*}

- ¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), Universidade Federal do Maranhão, São Luís 65080-805, MA, Brazil; auxiliadora.lopes@discente.ufma.br (A.C.C.B.L.); marcos.camara@discente.ufma.br (M.B.P.C.)
- ² Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara 14800-060, SP, Brazil; jessyane.nascimento@unesp.br
- ³ Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís 65080-805, MA, Brazil; aldilene.silva@ufma.br (A.d.S.L.); julia.xavier@icen.ufpa.br (J.K.A.M.X.); cjm.mendonca@ufma.br (C.d.J.S.M.)
- ⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina 64049-550, PI, Brazil; glaucialais@ufpi.edu.br (G.L.N.L.); matheusodn2@ufpi.edu.br (M.O.d.N.); aluismenezes@ufpi.edu.br (A.L.M.C.)
- ⁵ Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz 65900-410, MA, Brazil; caroline.mj@discente.ufma.br
- ⁶ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís 65080-805, MA, Brazil; lucilene.silva@ufma.br
- * Correspondence: rocha.claudia@ufma.br



Citation: Lopes, A.C.C.B.; do Nascimento, J.R.; Camara, M.B.P.; Lima, A.d.S.; Lopes, G.L.N.; do Nascimento, M.O.; Xavier, J.K.A.M.; de Jesus, C.M.; Mendonça, C.d.J.S.; Carvalho, A.L.M.; et al. Chemical Characterization, Leishmanicidal Activity and In Vitro Cytotoxicity of the Essential Oil Extracted from *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip. and Its Incorporation into Microemulsion Systems. *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 87. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16010087>

Academic Editor: Evgenia Mitsou

Received: 16 November 2023

Revised: 20 December 2023

Accepted: 5 January 2024

Published: 9 January 2024



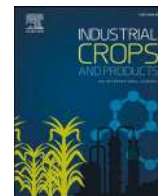
Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Pectis brevipedunculata* (Gardner) Sch.Bip., known in Brazil as alecrim do campo, is a small Asteraceae family plant with a calming effect and consumed as tea. This species contains components, such as neral and geranial, that display various biological activities, such as leishmanicidal. The aim was to chemically characterize the essential oil (EO) obtained from *P. brevipedunculata* (EO-PB) by hydrodistillation and a microemulsion formulated with EO (ME-PB), Tween 80 and Transcutol P, assess the leishmanicidal effect against *Leishmania* (L.) *amazonensis* promastigotes and cytotoxicity against RAW 264.7. EO-PB and ME-PB were analyzed by Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS). Monoterpene hydrocarbons were noteworthy among the identified compounds. The main EO-PB constituents were α -pinene and limonene, followed by neral and geranial, which were maintained in ME-PB. EO-PB presented an inhibitory concentration (IC₅₀) of 20 μ g/mL and ME-PB of 0.93 μ g/mL. ME-PB inhibition towards the parasite was 20-fold higher than that of EO-PB. This indicated that EO incorporation to the microemulsion resulted in optimized biological activity. Selectivity indices indicate that ME-PB is more selective concerning parasite inhibition. Thus, ME-PB may comprise an adequate approach against *Leishmania*, as the inhibitory concentration (IC₅₀) promastigotes was lower than that considered toxic for cells cell cytotoxicity of 50% (CC₅₀).

Keywords: Asteraceae; formulation; *L. (L.) amazonensis*; monoterpenes; nanotechnology; promastigote

1. Introduction

Pectis brevipedunculata (Gardner) Sch.Bip., popularly known in Brazil as alecrim do campo, capim-santo, catinga-de-formiga, limãozinho and capim-limão [1–3], belongs to the Asteraceae family and *Pectis* L. genus [3]. This plant is distributed throughout some



Chemical composition and potential antileishmanial and cytotoxic activity of *Duguetia stelechantha* (Diels) R.E.Fr. essential oil

Auxiliadora C.C. Barata Lopes^a, Marcos B.P. Camara^a, Aldilene S. Lima^b,
Matheus Oliveira do Nascimento^c, Júlia Karla A. M. Xavier^b, Caroline M. de Jesus^d,
Cáritas J.S. Mendonça^b, André Luis M. Carvalho^c, Lucilene A. Silva^e, Cláudia Q. da Rocha^{a,b,*,1}

^a Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), Universidade Federal do Maranhão, 65080-805 São Luís, MA, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Maranhão, 65080-805 São Luís, MA, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550 Teresina, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão, 65900-410 Imperatriz, MA, Brazil

^e Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, 65080-805 São Luís, MA, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Annonaceae
Ata brava
Formulation
L. (L.) amazonensis
Monoterpenes
RAW 264.7

ABSTRACT

Duguetia stelechantha (Diels) R.E.Fr., popularly known as “ata brava” in Brazil, belongs to the Annonaceae family. Biologically active monoterpenes and sesquiterpenes identified in this genus and family, comprising a source of new drugs against several conditions, including leishmaniasis. In this context, the aim of the present study was to extract and chemically characterize the essential oil (EO-DU) obtained from *D. stelechantha* for the first time. The potential antileishmanial activity and in vitro cytotoxicity of an EO microemulsion (EO-ME) formulated with Tween 80 and Transcutol P surfactants were also evaluated. *Duguetia stelechantha* leaves were submitted to a hydrodistillation process and their chemical composition was determined by GC/MS. The major identified EO components were β -pinene (46.17 %), α -pinene (20.2 %), and spathulenol (6.68 %). A headspace characterization indicated major EO-DU compounds present in the prepared ME, confirming incorporation. The extracted EO was moderately active against *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes ($IC_{50} = 138.3 \mu\text{g/mL}$), while the EO-ME was determined as active, inhibiting these parasites at a lower concentration ($IC_{50} = 4.47 \mu\text{g/mL}$) compared to the EO-DU, indicating high selectivity against *L. (L.) amazonensis* promastigotes. The major compound α -pinene was also tested, and presented $IC_{50} = 64.78 \mu\text{g/mL}$, considering it active against the tested parasites. Considering that *D. stelechantha* is an abundant species in the Brazilian Legal Amazon and that the antileishmanial potential of the extracted EO was enhanced by EM incorporation, this assessment provides relevant perspectives for future studies focused on the bioeconomy.

1. Introduction

Leishmaniasis affects 1 million of people worldwide every year (Jesus et al., 2021; WHO, 2023). American tegumentary leishmaniasis is a non-contagious infectious disease transmitted to humans through the bite of sandfly females (*Phlebotomus* and *Lutzomyia* genus) infected by protozoa belonging to the *Leishmania* genus. *Leishmania amazonensis* is

associated with American tegumentary leishmaniasis, causing skin and mucous membrane ulcers in humans (Lima et al., 2020).

The current arsenal used to treatment leishmaniasis comprises pentavalent antimonials, amphotericin B and its liposomal formulation AmBisome, miltefosine, paromomycin, and pentamidine. However, high toxicity to humans and cases of parasite resistance have led to limitations regarding these therapeutic resources (Neto et al., 2019;

* Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), Universidade Federal do Maranhão, 65080-805 São Luís, MA, Brazil.

E-mail addresses: auxiliadora.lopes@discente.ufma.br (A.C.C. Barata Lopes), marcos.camara@discente.ufma.br (M.B.P. Camara), aldilene@hotmial.com (A.S. Lima), matheusodn@hotmail.com (M.O. do Nascimento), julia.xavier@icen.ufpa.br (J.K.A. M. Xavier), caroline.mj@discente.ufma.br (C.M. de Jesus), caritasflordelotus@gmail.com (C.J.S. Mendonça), aluismenezes@ufpi.edu.br (A.L.M. Carvalho), luclene.silva@ufma.br (L.A. Silva), rocha.claudia@ufma.br (C.Q. da Rocha).

¹ ORCID: 0000-0002-3578-1869.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116978>

Received 6 April 2023; Received in revised form 29 May 2023; Accepted 1 June 2023

Available online 9 June 2023

0926-6690/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.



Review

A Review of the Phytochemistry and Pharmacological Properties of the Genus Arrabidaea

Jessyane Rodrigues do Nascimento ¹, Amanda de Jesus Alves Miranda ² , Felipe Costa Vieira ², Carla Daniele Pinheiro Rodrigues ² , Luna Nascimento Vasconcelos ² , José Lima Pereira Filho ², Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes ³, Marcelo Marucci Pereira Tangerina ⁴ , Wagner Vilegas ¹ and Cláudia Quintino da Rocha ^{2,3,*}

- ¹ Institut of Biosciences, Coastal Campus of São Vicente, Universidade Estadual Paulista-UNESP, São Vicente 11330-900, SP, Brazil; jessyane.nascimento@unesp.br (J.R.d.N.); vilegasw@gmail.com (W.V.)
- ² Department of Chemistry, Federal University of Maranhão-UFMA, São Luís 65080-805, MA, Brazil; amanda.quimica14@gmail.com (A.d.J.A.M.); felipe.cv@discente.ufma.br (F.C.V.); krla.pinheiro12@gmail.com (C.D.P.R.); luna.n.vasconcelos@gmail.com (L.N.V.); jlp.filho@outlook.com (J.L.P.F.)
- ³ Biodiversity and Biotechnology Graduate Program-BIONORTE, Federal University of Maranhão-UFMA, São Luís 65080-805, MA, Brazil; auxiliadorabarata@hotmail.com
- ⁴ Botany Department, Institute of Biosciences, University of São Paulo-USP, São Paulo 05508-090, SP, Brazil; marcelomptang@gmail.com
- * Correspondence: rocha.claudia@ufma.br



Citation: do Nascimento, J.R.; de Jesus Alves Miranda, A.; Vieira, F.C.; Rodrigues, C.D.P.; Vasconcelos, L.N.; Filho, J.L.P.; Lopes, A.C.C.B.; Tangerina, M.M.P.; Vilegas, W.; da Rocha, C.Q. A Review of the Phytochemistry and Pharmacological Properties of the Genus Arrabidaea. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 658. <https://doi.org/10.3390/ph15060658>

Academic Editor: Daniela De Vita

Received: 29 March 2022

Accepted: 23 May 2022

Published: 25 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The genus Arrabidaea, consisting of ~170 species, belongs to the family Bignoniaceae, distributed around the Neotropics and temperate zone. The center of diversity of the family is in Brazil, where 56 genera and about 340 species exist. Most species of the genus Arrabidaea are traditionally utilized as diuretics and antiseptics, as well as for treating intestinal colic, diarrhea, kidney stones, rheumatoid arthritis, wounds, and enterocolitis. The genus is chemically diverse with different substance classes; most of them are triterpenes, phenolic acids, and flavonoids, and they exhibit valuable pharmacological properties, such as antitumor, antioxidant, leishmanicidal, trypanocidal, anti-inflammatory, and healing properties. This review presents information on the chemical constituents isolated from seven Arrabidaea species, and the pharmacological activities of the extracts, fractions and pure substances isolated since 1994, obtained from electronic databases. The various constituents present in the different species of this genus demonstrate a wide pharmacological potential for the development of new therapeutic agents, however its potential has been underestimated.

Keywords: chemical composition; pharmacological activity; Arrabidaea; Cerrado

1. Introduction

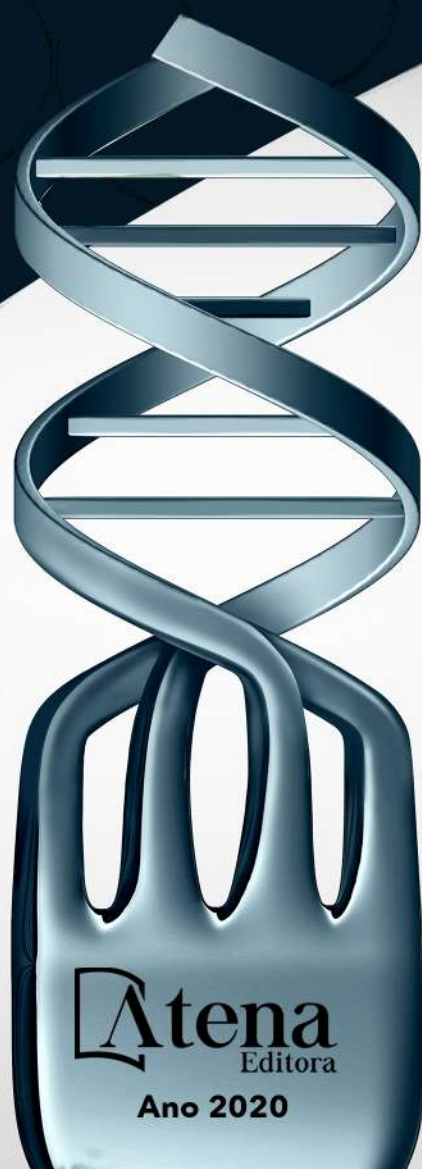
Bignoniaceae species are widely utilized for ornamental purposes owing to the beauty of their flowers (e.g., Ipê), as well as for civil construction and the production of musical instruments owing to the hardness of the wood [1].

Brazil represents the diversity center of the family, where 56 genera and ~340 species, including many endemic taxa, occur. The Bignoniaceae species are found in different kinds of environments ranging from the Cerrado to the rain and evergreen forests, thus representing the main family of lianas in Brazilian forests. The species from this taxon, whose jacarandás (*Jacaranda brasiliensis*), as well as yellow and purple ipês (*Tabebuia alba* and *Tabebuia avellanedae*), are the most representative examples of the family, are distributed in tropical regions globally, although they are more common in the American continent [2].

The genus Arrabidaea has a complex taxonomy since many characteristics are shared with species of other genera. The species can be a sub-shrub, a shrub, and even an upright tree with floral branches of 35–50 cm (the youngest being slightly flattened), with leaves with petioles of 5 to 10 mm, and sometimes 12 mm, as well as a simple blade. Further, it

EQUIDADE E SUSTENTABILIDADE NO CAMPO DA SEGURANÇA ALIMENTAR GLOBAL

FLÁVIO FERREIRA SILVA
(ORGANIZADOR)



Atena
Editora

Ano 2020

Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Prof. Me. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo
Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
E64	Equidade e sustentabilidade no campo da segurança alimentar global [recurso eletrônico] / Organizador Flávio Ferreira Silva. – Ponta Grossa, PR: Atena, 2020. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia. ISBN 978-65-5706-024-7 DOI 10.22533/at.ed.247202404 1. Alimentos – Análise. 2. Alimentos – Indústria. 3. Tecnologia de alimentos. I. Silva, Flávio Ferreira. CDD 664.07
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

CAPÍTULO 7 56

COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE IOGURTE GREGO COM GELEIA DE CAJÁ (*Spondia Mombin* L.) E PÓLEN APÍCOLA

Auriane Lima Santana
Jaqueline Martins de Paiva Lima
Isabelly Silva Amorim
Danyelly Silva Amorim
Josyane Brasil da Silva
João Hamilton Pinheiro de Souza
Adriano César Calandrini Braga
Bruna Almeida da Silva

DOI 10.22533/at.ed.2472024047

CAPÍTULO 8 63

ÓLEO DE SEMENTE DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis f. flavicarpa*): COMPOSIÇÃO QUÍMICA E FUNCIONALIDADE EM ALIMENTOS

Gerlane Souza de Lima
Francisco Humberto Xavier Júnior
Thayza Christina Montenegro Stamford

DOI 10.22533/at.ed.2472024048

CAPÍTULO 9 76

PROCESSAMENTO E COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA GELEIA DE ABRICÓ (*Mammea americana* L.)

Nayara Pereira Lima
Denzel Washihgton Cardoso Bom Tempo
Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes

DOI 10.22533/at.ed.2472024049

CAPÍTULO 10 85

ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA FARINHA DA CASCA DO MANGOSTÃO (*Garcinia mangostana* L.)

Isabelly Silva Amorim
Danyelly Silva Amorim
Jamille de Sousa Monteiro
Ana Beatriz Rocha Lopes
Andreza de Brito Leal
Marcos Daniel Neves de Sousa
Bruna Almeida da Silva
Adriano César Calandrini Braga

DOI 10.22533/at.ed.24720240410

CAPÍTULO 11 92

ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CENTESIMAL DE BOLINHO DE BATATA DOCE COM CORVINA (*Micropogonias furnieri*) DEFUMADA

Leliane da Silveira Barbosa Gomes
Jullie Nicole Jansen Siqueira
Jiullie Delany Bastos Monteiro
Élida de Souza Viana
Rayza Silva Pereira
Nara Hellem Brazão da Costa
Iara Eleni de Souza Pereira

PROCESSAMENTO E COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA GELEIA DE ABRICÓ (*Mammea americana* L.)

Data de aceite: 13/04/2020

Nayara Pereira Lima

Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Maranhão
São Luís – Maranhão

Denzel Washihgton Cardoso Bom Tempo

Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Maranhão
São Luís – Maranhão

Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes

Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Maranhão
São Luís – Maranhão

RESUMO: A geleia de fruta é o produto elaborado a partir da fruta, açúcar e água, sendo concentrado até atingir consistência gelatinosa. O abricó (*Mammea americana* L.) é uma fruta com característica silvestre. Dados relacionados à sua produção e comercialização são limitados, tornando interessante o estudo desta fruta. O objetivo deste trabalho foi elaborar a geleia de abricó e realizar a composição centesimal do produto. A matéria-prima utilizada para o desenvolvimento da geleia foi o abricó, açúcar cristal e limão. Foram realizadas as análises de pH, acidez titulável em ácido málico, umidade, cinzas, sólidos

solúveis, proteínas, lipídeos, carboidratos e valor calórico do produto. Das análises físico-químicas realizadas, os parâmetros sólidos solúveis e pH estão de acordo ou próximo com o previsto na literatura, no entanto, a acidez titulável em ácido orgânico mostrou-se acima do recomendado, porém, não houve alteração nas propriedades sensoriais do alimento. O produto elaborado da fruta abricó é relevante, principalmente porque pesquisas referentes à fruta e ao desenvolvimento de alimentos a partir dela são escassos, além de ser uma alternativa promissora para a agricultura familiar e possibilitar o desenvolvimento de um alimento prático e novo no mercado alimentício.

PALAVRAS-CHAVE: Composição Centesimal; Processamento; Fruta.

ABSTRACT: Fruit jelly is the product made from fruit, sugar and water, being concentrated until reaching gelatinous consistency. Apricot (*Mammea americana* L.) is a wild fruit. Data related to its production and marketing are limited, making the study of this fruit interesting. The objective of this work was to elaborate the apricot jelly and to make the centesimal composition of the product. The raw material used for the development of jelly was apricot, crystal sugar and lemon. Analyzes of pH, titratable

VANESSA BORDIN VIERA
JULIANA KÉSSIA BARBOSA SOARES
ANA CAROLINA DOS SANTOS COSTA
(ORGANIZADORAS)



PRÁTICA E PESQUISA EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS 4

 **Atena**
Editora

Ano 2020

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Bibliotecário Maurício Amormino Júnior
Diagramação: Maria Alice Pinheiro
Edição de Arte: Luiza Alves Batista
Revisão: Os Autores
Organizadores: Vanessa Bordin Viera
 Juliana Késsia Barbosa Soares
 Ana Carolina dos Santos Costa

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

P912 Prática e pesquisa em ciência e tecnologia de alimentos 4
 [recurso eletrônico] / Organizadores Vanessa Bordin
 Viera, Juliana Késsia Barbosa Soares, Ana Carolina dos
 Santos Costa. – Ponta Grossa, PR: Atena, 2020.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: World Wide Web.

Inclui bibliografia.

ISBN 978-65-5706-302-6

DOI 10.22533/at.ed.026202708

1. Alimentos – Análise. 2. Alimentos – Indústria. 3.
 Tecnologia de alimentos. I. Bordin, Vanessa. II. Soares,
 Juliana Késsia Barbosa. III. Costa, Ana Carolina dos Santos.

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

Atena Editora

Ponta Grossa – Paraná – Brasil

Telefone: +55 (42) 3323-5493

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br

CAPÍTULO 5.....46

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ANTIOXIDANTE DE SMOOTHIE DE MANGA (TOMMY ATKINS) COM FERMENTADO DE KEFIR DE ÁGUA E LEITE

Igor Souza de Brito
Esther Cristina Neves Medeiros
Jéssica Silva Medeiros
Pamella Cristina Teixeira
Lucas Henrique Santiago Dourado
Givanildo de Oliveira Santos
Marco Antônio Pereira da Silva

DOI 10.22533/at.ed.0262027085

CAPÍTULO 6.....57

DESENVOLVIMENTO DE CERVEJA ARTESANAL TIPO PILSEN COM ADIÇÃO DE POLPA DE ACEROLA, *MALPIGHIA EMARGINATA* DC

Antonio Carlos Freitas Souza
Jaqueline Freitas Souza
Evanilza Aristides Santana

DOI 10.22533/at.ed.0262027086

CAPÍTULO 7.....70

ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E QUIMIOMETRIA: FERRAMENTA PARA INVESTIGAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE LEITE POR RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICO

Alexandre Gomes Marques de Freitas
Bárbara Elizabeth Alves de Magalhães
Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes

DOI 10.22533/at.ed.0262027087

CAPÍTULO 8.....80

ESTABILIDADE DE FILMES BIODEGRADÁVEIS COM PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DE PESCADA AMARELA (*CYNOSCIION ACOUPA*)

Gleice Vasconcelos da Silva Pereira
Glaucé Vasconcelos da Silva Pereira
Eleda Maria Paixão Xavier Neves
Jose de Arimateia Rodrigues do Rego
Davi do Socorro Barros Brasil
Maria Regina Sarkis Peixoto Joele

DOI 10.22533/at.ed.0262027088

CAPÍTULO 9.....92

ESTUDO DA ESPÉCIE FRUTÍFERA CAFÉ-DO-AMAZONAS (*BUNCHOSIA GLANDULIFERA*): CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PROPOSTAS TECNOLÓGICAS DE UTILIZAÇÃO

Nayara Pereira Lima
Denzel Washihgton Cardoso Bom Tempo
Ana Maria Silva
Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes

DOI 10.22533/at.ed.0262027089

ESTUDO DA ESPÉCIE FRUTÍFERA CAFÉ-DO-AMAZONAS (*BUNCHOSIA GLANDULIFERA*): CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PROPOSTAS TECNOLÓGICAS DE UTILIZAÇÃO

Data de aceite: 01/07/2020

Nayara Pereira Lima

Universidade Estadual de Londrina, Londrina,
PR. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5587861574886419>

Denzel Washihgton Cardoso Bom Tempo

Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Maranhão – Campus São Luís-
Maracanã, São Luís, MA. Currículo Lattes:
<http://lattes.cnpq.br/6781232505591626>

Ana Maria Silva

Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Maranhão – Campus São Luís-
Maracanã, São Luís, MA. Currículo Lattes:
<http://lattes.cnpq.br/9348000961533319>

Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes

Universidade Federal do Maranhão, São
Luís, MA. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6387155348626325>

RESUMO: O fruto de *Bunchosia glandulifera* é cultivado principalmente nas regiões do sul da América, abrangendo o Brasil. É conhecido por café-do-amazonas, porém, também pode ser denominado como caferana, cafezinho, ameixa-do-pará, ciruela, caramel, ameixa-brava, ameixa-do-peru e falso-guaraná. Dados relacionados à sua produção, aplicação e comercialização são limitados, tornando ainda mais interessante o estudo desta fruta. O objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização físico-

química da fruta café-do-amazonas (*Bunchosia glandulifera*), propor tecnologias de utilização e fornecer dados para a literatura científica visando contribuir com pesquisas futuras relacionadas à fruta. Foram realizadas as análises de pH, acidez titulável, umidade, cinzas, °BRIX, proteínas, lipídeos, carboidratos e valor calórico do fruto. Os resultados encontrados para os parâmetros citados anteriormente, constatarem o potencial da fruta utilizada na pesquisa, pois ela apresentou acidez titulável reduzida (0,41%), pH igual a 5,77, quantidade significativa de minerais em sua composição (cinzas = 2,23%) e teor elevado de carboidratos (16,06%), °BRIX (11,86) e lipídios (11,22 g/100g), podendo ser aplicada no processamento de doces, geleia e sorvete. Além disso, o trabalho propõe a investigação da composição centesimal da semente do fruto de *Bunchosia glandulifera*, com o intuito de conhecer e possivelmente aproveitar essa parte da fruta, desenvolvendo farinha e aplicando em produtos da área de panificação. Os dados encontrados foram promissores para a literatura científica, visto que, a fruta café-do-amazonas não é muito explorada, apesar da sua excelente composição físico-química.

PALAVRAS-CHAVE: Fruta; caracterização; físico-química; *Bunchosia glandulifera*.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
INSTITUTO FEDERAL DO MARANHÃO

CERTIFICADO



Certificamos que o trabalho intitulado **"Investigação da ação leishmanicida e citotoxicidade in vitro do óleo essencial e microemulsão de Pectis brevipedunculata (Gardner) Sch.Bip."** de autoria de **Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes, Marcos Bispo Pinheiro Camara, Aldilene da Silva Lima, Júlia Karla Albuquerque Melo Xavier, Caroline Martins de Jesus, Cáritas de Jesus Silva Mendonça, Lucilene Amorim Silva e Claudia Quintino da Rocha**, foi apresentado na modalidade **Exposição de poster** durante o **1º EPQuim UFMA-IFMA: ENCONTRO DE COOPERAÇÃO DOS PROGRAMAS DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**, realizado no período de 12/03/2024 a 15/03/2024 na Universidade Federal do Maranhão (UFMA), em São Luís.

Antonio José Cantanheide Filho

Prof. Dr. Antonio José Cantanheide Filho
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Química do IFMA

Cláudia B. da Rocha

Profª Drª. Cláudia Quintino da Rocha
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Química da UFMA

Gilmar Silvério da Silva

Prof. Dr. Gilmar Silvério da Silva
Coordenador do Doutorado Associativo do IFMA
(Coordenador local)

Rita de Cássia Silva Luz

Profª Drª. Rita de Cássia Silva Luz
Coordenadora Geral do Doutorado em Química
Associativo UFMA - IFMA



PROAP
Programa de Apoio à
Pós-Graduação

PROCAD
Programa Nacional de
Cooperação Acadêmica





UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
INSTITUTO FEDERAL DO MARANHÃO

CERTIFICADO



Certificamos que o trabalho intitulado **"Atividade leishmanicida do óleo essencial de Duguetia stelechantha incorporado em microemulsão"** de autoria de **Isanna Myllena Borba Guimarães Bezerra, Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes e Claudia Quintino da Rocha**, foi apresentado na modalidade **Exposição de poster** durante o **1º EPQuim UFMA-IFMA: ENCONTRO DE COOPERAÇÃO DOS PROGRAMAS DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**, realizado no período de 12/03/2024 a 15/03/2024 na Universidade Federal do Maranhão (UFMA), em São Luís.

Antonio José Cantanheide Filho

Prof. Dr. Antonio José Cantanheide Filho
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Química do IFMA

Cláudia B. da Rocha

Profª Drª. Cláudia Quintino da Rocha
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Química da UFMA

Gilmar Silvério da Silva

Prof. Dr. Gilmar Silvério da Silva
Coordenador do Doutorado Associativo do IFMA
(Coordenador local)

Rita de Cássia Silva Luz

Profª Drª. Rita de Cássia Silva Luz
Coordenadora Geral do Doutorado em Química
Associativo UFMA - IFMA



PROAP
Programa de Apoio à
Pós-Graduação

PROCAD
Programa Nacional de
Cooperação Acadêmica



47^a

Reunião anual
da SBQ

WWW.SBQ.ORG.BR

22 a 25 de maio de 2024 · Águas de Lindóia



Sociedade Brasileira de Química

A CENTRALIDADE DA QUÍMICA NA
EDUCAÇÃO DO CIDADÃO E NA INOVAÇÃO
CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA

Atestamos que o trabalho "**Potential of microemulsion of essential oil of Pectis brevipedunculata (Gardner) Sch.Bip. against L. (L.) amazonensis promastigotes and RAW 264.7 cells**", autoria de **Cláudia Quintino da Rocha, Auxiliadora Cristina Correa Barata Lopes, Marcos Bispo Pinheiro Camara, Gláucia Laís Nunes Lopes, Matheus Oliveira do Nascimento, Júlia Karla A. M. Xavier, Cáritas de Jesus Silva Mendonça e André Luis Menezes Carvalho**, foi apresentado na forma de pôster durante a 47^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Shirley Nakagaki Bastos
Presidente da SBQ

Luiz Gonzaga de França Lopes
Secretário Geral da SBQ



XIV Simpósio Brasileiro de Farmacognosia

São Luís- MA

CERTIFICADO:

Certificamos que o trabalho intitulado “o “*Pectis brevipedunculata*: investigações sazonais, circadianos, química e no efeito sobre *Rhipicephalus micropus* e *Haemonchus contortus*” autoria de Marcos Bispo Pinheiro Camara, Nayane Araújo Carvalho, Raimundo Kêrmenson Coelho Moraes, Aldilene da Silva Lima, Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes, Cáritas de Jesus Silva Mendonça, Carla Janaina Rebouças Marques do Rosário, Cláudia Quintino da Rocha foi apresentado na modalidade “Pôster” no **XIV Simpósio Brasileiro de Farmacognosia**, realizado na Universidade Federal do Maranhão em São Luís, no período de 23 a 26 de maio de 2023.

Profª Dra. Crisálida Machado Vilanova
Presidente da Comissão Organizadora

Profº Dr. Douglas Siqueira A. Chaves
Presidente da Sociedade Brasileira de Farmacognosia

Realização:



SBFgnosia



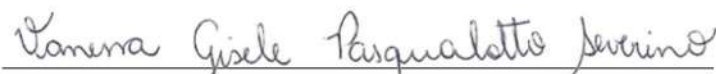


Certification

We hereby certify that the abstract entitled
CHEMICAL CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL EVALUATION OF *Pectis brevipedunculata* (Asteraceae)

from the
Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes

was presented during the **8th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP)** and
XXXIV Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (RESEM),
held online between November 09-12, 2021.


Prof. Dr. Vanessa G. Pasqualotto Severino
President of the Organizing Committee


Prof. Dr. Thiago André Moura Veiga
President of the Scientific Committee



I Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos: a diversidade da atuação profissional e pesquisa no Brasil

CERTIFICADO

Certificamos que **Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes**, participou, na qualidade de **Palestrante**, do evento **I Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos: a diversidade da atuação profissional e pesquisa no Brasil**, ministrando a atividade **Palestra - Aplicação de Óleos Essenciais na Indústria de Alimentos** contabilizando carga horária total de 2 horas.

16 de Dezembro de 2021



Coordenação Geral do I SCTA BRASIL

Nayara Pereira Lima

APOIO:





UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
INSTITUTO FEDERAL DO MARANHÃO

CERTIFICADO



Certificamos que **AUXILIADORA CRISTINA CORRÊA BARATA LOPES** participou do **1º EPQuim UFMA-IFMA: ENCONTRO DE COOPERAÇÃO DOS PROGRAMAS DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**, realizado na Universidade Federal do Maranhão (UFMA) em São Luís, no período de 12/03/2024 a 15/03/2024.

Antonio José Cantanheide Filho

Prof. Dr. Antonio José Cantanheide Filho
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Química do IFMA

Cláudia B. da Rocha

Profª Drª. Cláudia Quintino da Rocha
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Química da UFMA

Gilmar Silvério da Silva

Prof. Dr. Gilmar Silvério da Silva
Coordenador do Doutorado Associativo do IFMA
(Coordenador local)

Rita de Cássia Silva Luz

Profª Drª. Rita de Cássia Silva Luz
Coordenadora Geral do Doutorado em Química
Associativo UFMA - IFMA



PROAP
Programa de Apoio à
Pós-Graduação

PROCAD
Programa Nacional de
Cooperação Acadêmica





2º Congresso Brasileiro de Biodiversidade e Biotecnologia da **AMAZÔNIA**



📍 | HANGAR CENTRO DE CONVENÇÕES, BELÉM - PA

CERTIFICADO

Certificamos que **Auxiliadora B Lopes** participou do **2º Congresso Brasileiro de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia**, evento promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede **BIONORTE**, no período de 08 a 12 de agosto de 2022, Hangar Centro de Convenções da Amazônia, na qualidade de **CONGRESSISTA**.

CARGA HORÁRIA: 40 HORAS

Belém, 12 de agosto de 2022

Profa. Dra. Boisa Helena de Aguiar Andrade
Presidente da Comissão Científica do 2º CBBBA
Coordenadora Estadual/ PA- PPG-BIONORTE

Prof. Livre-Docente Sandro Percário
Presidente do 2º CBBBA
Coordenador Geral do PPG-BIONORTE

REALIZAÇÃO:



PATROCÍNIO:



ORGANIZAÇÃO:





UNIVERSIDADE
FEDERAL
DE PERNAMBUCO



NUDFAC
Núcleo de Desenvolvimento
Farmacêutico e Cosméticos

Certificamos que **Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes**, participou com êxito do evento IV Workshop em Bioanálise e Métodos Alternativos, III Workshop em Bioequivalência de produtos tópicos e I Workshop em Avaliação da permeação cutânea de produtos agroquímicos. Realizado em 14/06/2022 a 15/06/2022, na Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil. Carga horária total de 16 horas.

Recife, 16 de Junho de 2022.

Pr^{fa} Dra. Leila Bastos Leal
Coordenadora do BioAltern IV

Patrocínio:

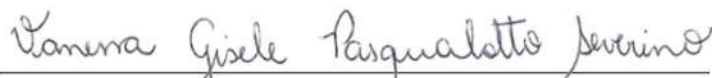


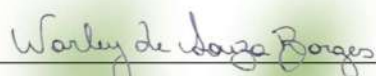
Certificate

We hereby certify that

Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes

has attended the **8th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP) and XXXIV Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (RESEM)**, helded online between November 09-12, 2021.


Prof. Dr. Vanessa G. Pasqualotto Severino
President of the Organizing Committee


Prof. Warley de Souza Borges
Director of the Natural Products Division of the Brazilian Chemical Society





Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal

O Programa de pós-graduação em Biodiversidade,
Conservação e Biotecnologia da Rede Bionorte
certifica que

Auxiliadora Cristina Correa Barata Lopes

participou do evento intitulado
Seminários em Biodiversidade, Conservação e Biotecnologia
realizado no período de 19 à 30 de Julho, com uma carga
horária de 12 horas.

Dr. Livio Martins Costa Junior

CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO



Certificamos que,
Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes

participou do evento *On-Line*

SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE QUÍMICA & V WORKSHOP DE BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE

**realizado pelas Regionais da Associação Brasileira de Química do Amapá
e Mato Grosso (ABQ AP e ABQ MT), Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biotecnologia (Rede BIONORTE)
entre os dias 16 ao dia 18 de junho de 2021,
Com carga horária de 34 horas.**

Prof. Dr. Cleydson Breno Rodrigues dos Santos
Presidente da ABQ - Regional Amapá
Coordenador Geral do Evento
Coordenador do PPGBIONORTE - Amapá
Portaria nº 1541/2020 - UNIFAP

Prof. Dr. José Masson
Presidente da ABQ - Regional Mato Grosso

Realização:



Apoio:





UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
INSTITUTO FEDERAL DO MARANHÃO

CERTIFICADO

MINICURSO



Certificamos que **AUXILIADORA CRISTINA CORRÊA BARATA LOPES**, participou com êxito do **Minicurso - Determinação estrutural de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico utilizando RMN de ^1H e ^{13}C 1D/2D e Espectrometria de Massas**, realizado em São Luís nos dias 13/03/2024 e 14/03/2024, durante o 1º EPQuim UFMA-IFMA: ENCONTRO DE COOPERAÇÃO DOS PROGRAMAS DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA, contabilizando uma carga horária total de **20 (vinte) horas**.

Antonio José Cantanheide Filho

Prof. Dr. Antonio José Cantanheide Filho
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Química do IFMA

Cláudia B. da Rocha

Profª Drª. Cláudia Quintino da Rocha
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Química da UFMA

Gilmar Silvério da Silva

Prof. Dr. Gilmar Silvério da Silva
Coordenador do Doutorado Associativo do IFMA
(Coordenador local)

Rita de Cássia Silva Luz

Profª Drª. Rita de Cássia Silva Luz
Coordenadora Geral do Doutorado em Química
Associativo UFMA - IFMA



PROAP
Programa de Apoio à
Pós-Graduação

PROCAD
Programa Nacional de
Cooperação Acadêmica





Certificate of attendance

Auxiliadora Cristina Correa Barata Lopes

HAS COMPLETED A WEBINAR

Desmistificando a Técnica de Headspace - CH: 30 minutos



Shimadzu do Brasil Comércio Ltda

EVENT HOST



Minicurso "Análise de óleos essenciais: uma tarefa complexa"

ATESTADO

Atestamos que **Auxiliadora Cristina Corrêa Barata** participou do minicurso "Análise de óleos essenciais: uma tarefa complexa" ministrado por **Humberto Ribeiro Bizzo (Embrapa)**, nos dias 09/08, 11/08, 16/08 e 18/08/2022, em formato on line.

Carga horária: 08 horas.

São Paulo, 18 de Agosto de 2022.

Luiz Gonzaga de França Lopes
Secretário Geral da
Sociedade Brasileira de Química - SBQ



2º Congresso Brasileiro de Biodiversidade e Biotecnologia da **AMAZÔNIA**



📍 | HANGAR CENTRO DE CONVENÇÕES, BELÉM - PA

CERTIFICADO

Certificamos que **Auxiliadora B Lopes** participou do Minicurso: **MC 11 - Presencial - Óleos essenciais: da biossíntese ao cosmético**, durante o **2º Congresso Brasileiro de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia**, evento promovido pelo **Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE**, no período de 08 a 12 de agosto de 2022, Hangar Centro de Convenções da Amazônia

CARGA HORÁRIA: 4h.

Belém, 12 de agosto de 2022

Profa. Dra. Boisa Helena de Aguiar Andrade
Presidente da Comissão Científica do 2º CBBBA
Coordenadora Estadual/ PA- PPG-BIONORTE

Prof. Livre-Docente Sandro Percário
Presidente do 2º CBBBA
Coordenador Geral do PPG-BIONORTE

REALIZAÇÃO:



PATROCÍNIO:



ORGANIZAÇÃO:





2º Congresso Brasileiro de Biodiversidade e Biotecnologia da **AMAZÔNIA**



📍 | HANGAR CENTRO DE CONVENÇÕES, BELÉM - PA

CERTIFICADO

Certificamos que **Auxiliadora B Lopes** participou do Minicurso: **MC 03 - Presencial - Por que microencapsular óleos essenciais?** durante o **2º Congresso Brasileiro de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia**, evento promovido pelo **Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE**, no período de 08 a 12 de agosto de 2022, Hangar Centro de Convenções da Amazônia

CARGA HORÁRIA: 4h.

Belém, 12 de agosto de 2022

Profa. Dra. Boisa Helena de Aguiar Andrade
Presidente da Comissão Científica do 2º CBBBA
Coordenadora Estadual/ PA- PPG-BIONORTE

Prof. Livre-Docente Sandro Percário
Presidente do 2º CBBBA
Coordenador Geral do PPG-BIONORTE

REALIZAÇÃO:



PATROCÍNIO:



ORGANIZAÇÃO:



CERTIFICADO DE MINICURSO



Certificamos que **Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes**, participou com êxito do Minicurso **MCG2 - A Química Verde inserida na bioeconomia baseada no conhecimento**, realizado em 16 de junho de 2021, durante o evento On-Line **Simpósio Latino-Americano de Química & V Workshop de Biotecnologia da Rede Bionorte**, contabilizando carga horária total de 2 horas.

Prof. Dr. Cleydson Breno Rodrigues dos Santos
Presidente da ABQ - Regional Amapá
Coordenador Geral do Evento
Coordenador do PPGBIONORTE - Amapá
Portaria nº 1541/2020 - UNIFAP

Prof. Dr. José Masson
Presidente da ABQ - Regional Mato Grosso

Realização:



Apoio:





agrotins 20 anos
CERRADO SUSTENTÁVEL



A PRIMEIRA
DO BRASIL

FEIRA AGROTECNOLOGICA DO TOCANTINS

CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO

Certifico que
Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes

participou do evento

Palestra: Biotecnologia a serviço da sustentabilidade

Durante a 20ª Feira Agrotecnológica de Palmas – Agrotins, entre os dias 27 e 29 de maio de 2020, com carga horária de 1 hora.



César Halum
Secretário de Estado

SECRETARIA DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E AQUICULTURA

TOCANTINS
GOVERNO DO ESTADO





UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO



Certificamos que **AUXILIADORA CRISTINA CORREA BARATA LOPES** participou do evento **WEBINÁRIO - ESCOLHA DE TESTES ESTATÍSTICOS PARA ANÁLISES BIOLÓGICAS** realizado durante o período de **14/07/2020** a **14/07/2020** como **OUVINTE** com uma frequência de **100%** e uma carga horária de 2 hora(s).

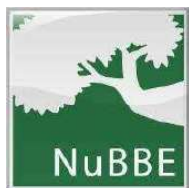
São Luís, 15 de Julho de 2020

Sílvio Gomes Monteiro
Palestrante

Número do documento: **10821** Código de Verificação: **2864ff795a**

Para verificar a autenticidade deste documento acesse
<https://sigeventos.ufma.br/eventos/documentos>, informando o número do documento, data de emissão do documento e o código de verificação.

CERTIFICADO



Certifico que

Auxiliadora Cristina Correa Barata Lopes

participou do evento

**"Introdução a rede de interações moleculares
e a utilização da plataforma GNPS"**

no dia 20/07/2020.

Alberto J. Cavaleiro

Isabel D. Coutinho

Luiz A. Dutra

unesp
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CERTIFICADO

Certifico que Auxiliadora Cristina Correa Barata Lopes participou como ouvinte da(s) palestra(s) realizada(s) durante o Ciclo de Seminários Webinar do PGQUI-UESB.

Tema, carga horária e data dos seminários:

- 3) Óleos essenciais: aspectos gerais, Palestrante Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar (1,5 h) – 27/07/2020.

Jequié-BA, 31 de julho de 2020.



Ouvinte

Cleber Galvão Novaes
Coordenador do PGQUI

CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO



Certifico que



Auxiliadora Cristina Correa Barata Lopes

participou do evento

"Ferramentas automatizadas para
desenvolvimento de métodos cromatográficos:
Fusion Quality by Design"

no dia 11/08/2020.

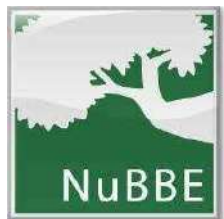
Alberto J. Cavaleiro

Isabel D. Coutinho

Luiz A. Dutra



CERTIFICADO PARTICIPAÇÃO



Certifico que

Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes

participou do evento

"Espectometria de massas: possibilidades
experimentais no âmbito do parque instrumental do
NuBBE"

no dia 06/07/2020.

Alberto José Cavalheiro

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"





UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
INSTITUTO FEDERAL DO MARANHÃO

CERTIFICADO

PREMIAÇÃO



Certificamos que o trabalho intitulado **"Investigação da ação leishmanicida e citotoxicidade in vitro do óleo essencial e microemulsão de Pectis brevipedunculata (Gardner) Sch.Bip."**, tendo como autores **Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes, Marcos Bispo Pinheiro Camara, Aldilene da Silva Lima, Júlia Karla Albuquerque Melo Xavier, Caroline Martins de Jesus, Cáritas de Jesus Silva Mendonça, Lucilene Amorim Silva e Claudia Quintino da Rocha** foi **premiado** na área de **Química Orgânica**, na modalidade **Exposição de poster**, no evento **1º EPQuim UFMA-IFMA: ENCONTRO DE COOPERAÇÃO DOS PROGRAMAS DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**, realizado na Universidade Federal do Maranhão (UFMA), em São Luís, nos dias 12/03/2024 a 15/03/2024.

Antonio José Cantanheide Filho

Prof. Dr. Antonio José Cantanheide Filho
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Química do IFMA

Cláudia B. da Rocha

Profª Drª. Cláudia Quintino da Rocha
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Química da UFMA

Gilmar Silvério da Silva

Prof. Dr. Gilmar Silvério da Silva
Coordenador do Doutorado Associativo do IFMA
(Coordenador local)

Rita de Cássia Silva Luz

Profª Drª. Rita de Cássia Silva Luz
Coordenadora Geral do Doutorado em Química
Associativo UFMA - IFMA



PROAP
Programa de Apoio à
Pós-Graduação

PROCAD
Programa Nacional de
Cooperação Acadêmica





UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Fundação Instituída nos termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 – São Luís - Maranhão.

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que os professores abaixo relacionados participaram da Banca Examinadora para Avaliação da Monografia de Conclusão de Curso da aluna Lice Kerly Silva Sousa, sob o título “CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Krameria Tomentosa* A. St-Hill” defendida e aprovada no dia 21 de janeiro de 2022.

- Dra. Cláudia Quintino da Rocha

- Dra. Ilisandra Zanandrea

- **Me. Auxiliadora Cristina Corrêa Barata Lopes**

Coordenadoria do Curso de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Maranhão em São Luís, 21 de janeiro de 2022.

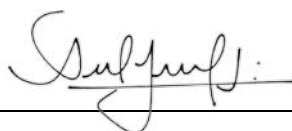
Profa. Dra. Wilma dos Santos Eugênio

Coordenadora Curso Ciências Biológicas UFMA

SIAPE 3089357

CERTIFICADO

Certificamos, para os devidos fins, que **Auxiliadora Cristina Correa Barata Lopes** atuou como avaliador (a) de trabalhos científicos do VI Simpósio em Ensino Tecnológico no Amazonas - SETA, realizado pelo Programa de Pós-graduação em Ensino Tecnológico - PPGET do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Campus Manaus Centro - IFAM/CMC, nos dias 18 e 19/11/2020.



Prof.ª. Dr.ª. Andréa Pereira Mendonça
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Ensino Tecnológico - PPGET



Prof. Dr. Nilton Paulo Ponciano
Presidente do VI Seta
Portaria n. 504 – Gab/DG/CMC/IFAM