



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ**  
**PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**CURSO DE FARMÁCIA**

**BRUNA NASCIMENTO FLEXA**

**INFLUÊNCIA DE DISTINTOS QUIMIOTIPOS DE *Lippia alba* NA ESTABILIZAÇÃO  
DE NANO-EMULSÕES**

**Macapá**  
**2023**

**BRUNA NASCIMENTO FLEXA**

**INFLUÊNCIA DE DISTINTOS QUIMIOTIPOS DE *Lippia alba* NA ESTABILIZAÇÃO  
DE NANO-EMULSÕES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Caio Pinho Fernandes

**Macapá**  
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca Central/UNIFAP-Macapá-AP  
Elaborado por Mário das Graças Carvalho Lima Júnior – CRB-2 / 1451

---

- F619 Flexa, Bruna Nascimento.  
Influência de distintos quimiotipos de *Lippia alba* na estabilização de nano-emulsões / Bruna Nascimento Flexa. - Macapá, 2023.  
1 recurso eletrônico. 38 folhas.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Curso de Farmácia, Macapá, 2023.  
Orientador: Caio Pinho Fernandes.
- Modo de acesso: World Wide Web.  
Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).
1. Carvona. 2. Citral. 3. Nanoemulsificação. I. Fernandes, Caio Pinho, orientador. II. Universidade Federal do Amapá. III. Título.

CDD 23. ed. – 615

---

**BRUNA NASCIMENTO FLEXA**

**INFLUÊNCIA DE DISTINTOS QUIMIOTIPOS DE *Lippia alba* NA ESTABILIZAÇÃO  
DE NANO-EMULSÕES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Data de Aprovação: 12/04/2023

Documento assinado digitalmente  
 CAIO PINHO FERNANDES  
Data: 10/05/2023 11:49:53-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Orientador: Prof. Dr. Caio Pinho Fernandes – UNIFAP**

Documento assinado digitalmente  
 FRANCISCO PAIVA MACHADO  
Data: 09/05/2023 10:32:55-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Avaliador: Prof. Dr. Francisco Paiva Machado - UFF**

Documento assinado digitalmente  
 MIKAELA AMARAL FERREIRA  
Data: 09/05/2023 11:53:10-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Avaliador: Mikaela Amaral Ferreira - UNIFAP**

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais Waldery e Ivaneide, pelo amor incondicional, incentivo e por serem meu maior exemplo de força, determinação e coragem.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir chegar ao final de mais uma etapa importante da minha vida, por me dar forças para alcançar meus objetivos e por me mostrar que sou mais forte do que eu penso.

Aos meus pais, Waldery e Ivaneide, por serem minha base e por sempre me orientarem a estudar e focar no meu futuro. Obrigada por serem meu suporte, por compreenderem meus momentos de ausência que foram dedicados à minha formação e por me ensinarem que se eu quiser, posso voar para muitos lugares mas que eu sempre saberei o caminho para voar de volta pra casa.

À minha família em Santana por tornarem essa caminhada mais leve, por terem me acolhido como filha, irmã e por cuidarem de mim como meus pais cuidariam.

À minha família em Almeirim por todo amor, apoio, incentivo e por acreditarem no meu potencial em momentos que nem eu acreditei.

Aos meus sobrinhos, David e Pedro, por me mostrarem a pureza e doçura em ser criança e por me receberem nas férias em Almeirim com alegria e com aquele abraço gostoso.

Ao meu orientador, professor Caio Fernandes, por te me acolhido em seu grupo de pesquisa no Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica (Nanofito) desde a iniciação científica e por me incentivar no caminho da pesquisa científica. Obrigada pela amizade, paciência e por contribuir com meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus queridos amigos que conheci na fila de matrícula, Ana Clara Pantoja, Caio Arrelias, Harlena Santos, Karinne Costa e aos amigos Annita Neri, Ericlison Willlian e Jhonatan Clisman por todos os cafés, risadas e perrengues compartilhados ao longo da graduação. Agradeço imensamente pela amizade construída ao longo desses 5 anos, por cada momento que dividimos e pela certeza de que muitos outros ainda estão por vir, cada um tem um espaço especial no meu coração.

À minha grande amiga Rafaela Marques por todo apoio, pelo incentivo diário e por ter sido meu ombro amigo nos momentos de dificuldade. Sua amizade foi um grande presente que a Farmácia me trouxe.

A todos os amigos que fiz no laboratório Nanofito pela troca de experiências, por todas as tardes de cafés com biscoitos e por todos os momentos de descontração. Vocês foram essenciais nessa caminhada.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Pedras no caminho?  
Guardo todas, um dia vou construir um  
castelo”*

Fernando Pessoa

## RESUMO

A espécie vegetal *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson, pertencente à família Verbenaceae, é popularmente conhecida como erva-cidreira e é amplamente distribuída em todo o território brasileiro. Esta espécie é conhecida por apresentar uma variabilidade quantitativa e qualitativa na composição química do seu óleo essencial, apresentando, portanto, distintos quimiotipos. A análise química do óleo essencial de *Lippia alba* é de grande importância porque seus constituintes podem afetar características como a sua solubilidade intrínseca. Além disso, os sistemas nanoestruturados, dentre eles as nano-emulsões, se apresentam como excelente alternativa para otimizar as características de um óleo essencial. Portanto, o objetivo deste trabalho é realizar a investigação dos fenômenos de geração e estabilização das nanogotículas a partir de diferentes quimiotipos de *Lippia alba*, observando a influência de sua composição química nos fenômenos. Os óleos essenciais foram extraídos pela técnica de hidrodestilação em aparato do tipo Clevenger e caracterizados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Neste trabalho, foi utilizada uma abordagem de baixo aporte de energia para a obtenção das nano-emulsões (quimiotipos citral e carvona de *Lippia alba*). As nano-emulsões foram preparadas em duas etapas, inicialmente por dispersão dos óleos essenciais em glicerina e posterior adição desses sistemas em água deionizada. As nano-emulsões produzidas foram avaliadas macroscopicamente e a análise de distribuição de tamanho de gotículas foi realizada por espalhamento dinâmico da luz em um equipamento Zetasizer Malvern NanoZS, as medidas foram realizadas em triplicata e os gráficos interpretados em termos de diâmetro médio e índice de polidispersão. Foi observado um aumento de 160% em relação ao tamanho de gotícula da nano-emulsão preparada com o quimiotipo carvona após 24h. Quando diluída, essa nano-emulsão apresentou aumento de gotícula em torno de 65%. Embora a nano-emulsão preparada com o quimiotipo citral tenha apresentado diâmetro de gotícula maior do que o quimiotipo carvona, a análise da amostra diluída revelou um menor aumento do tamanho de gotícula (~20%). Esse efeito pode estar associado a uma maior área superficial e facilidade de migração dos componentes das gotículas das nano-emulsões à base do óleo essencial do quimiotipo carvona. O presente trabalho permitiu uma investigação da geração, formação e estabilização de nano-emulsões à base de óleos essenciais, com interpretação dos resultados em função das diferenças nos perfis fitoquímicos dos diferentes quimiotipos.

**Palavras-chave:** Carvona. Citral. Monoterpenos. Nanoemulsificação. Óleo essencial.

## ABSTRACT

The plant species *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson, belonging to the Verbenaceae family, is popularly known as ‘erva-cidreira’ and is widely distributed throughout Brazil. This species is known for presenting a quantitative and qualitative variability in the chemical composition of its essential oil, presenting, therefore, different chemotypes. The chemical analysis of *Lippia alba* essential oil is of great importance because its constituents can affect characteristics such as its intrinsic solubility. In addition, nanostructured systems, including nano-emulsions, are an excellent alternative to optimize the characteristics of essential oil. Therefore, the objective of this work is to investigate the phenomena of generation and stabilization of nanodroplets from different chemotypes of *Lippia alba*, observing the influence of their chemical composition on the phenomena. The essential oils were extracted by the technique of hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus and characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry. In this work, a low-energy approach was used to obtain nano-emulsions (citral and carvone chemotypes from *Lippia alba*). The nano-emulsions were prepared in two steps, initially by dispersing the essential oils in glycerin and then adding these systems to deionized water. The produced nano-emulsions were evaluated macroscopically and the droplet size distribution analysis was performed by dynamic light scattering in a Zetasizer Malvern NanoZS equipment, the measurements were performed in triplicate and the graphs were interpreted in terms of mean diameter and polydispersion index. An increase of 160% was observed about the droplet size of the nano-emulsions prepared with the carvone chemotype after 24h. When diluted, these nano-emulsions showed a droplet increase of around 65%. Although the nano-emulsions prepared with the citral chemotype showed a larger droplet diameter than the carvone chemotype, analysis of the diluted sample revealed a smaller increase in droplet size (~20%). This effect may be associated with a greater surface area and ease of migration of the droplet components of nano-emulsions based on the essential oil of the carvone chemotype. The present work allowed an investigation of the generation, formation, and stabilization of nano-emulsions based on essential oils, with an interpretation of the results in function of the differences in the phytochemical profiles of the different chemotypes.

**Keywords:** Carvone. Citral. Monoterpenes. Nanoemulsification. Essential oil.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	– Espécie <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson .....	14
<b>Figura 2</b>	– Estrutura química do citral .....	17
<b>Figura 3</b>	– Estrutura química do enantiômero (4R)-(-)-carvona .....	18
<b>Figura 4</b>	– Representação esquemática dos tipos de nano-emulsões .....	20
<b>Figura 5</b>	– Fenômenos físico-químicos de instabilidade das nano-emulsões .....	22
<b>Figura 6</b>	– Representação das etapas para obtenção das nano-emulsões .....	24
<b>Figura 7</b>	– Misturas de <i>L. alba</i> quimiotipos carvona (esquerda) e citral (direita) e glicerina .....	29
<b>Figura 8</b>	– Nano-emulsões obtidas mediante adição de sistema disperso constituído por polisorbato 20/OE <i>L. alba</i> /glicerina em água .....	30
<b>Figura 9</b>	– Gráficos de distribuição de tamanho de gotícula das nano-emulsões preparadas com OEs de <i>L. alba</i> (quimiotipos carvona e citral) .....	31

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>13</b>
3.1	ÓLEOS ESSENCIAIS .....	<b>13</b>
3.2	<i>Lippia alba</i> .....	14
3.3	VARIAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Lippia alba</i> .....	15
3.4	QUIMIOTIPOS DE <i>Lippia alba</i> ESTUDADOS .....	17
3.4.1	<b>Citral</b> .....	17
3.4.2	<b>Carvona</b> .....	18
3.5	NANOTECNOLOGIA .....	19
<b>3.5.1</b>	<b>Nano-emulsões</b> .....	<b>20</b>
<b>3.5.1.1</b>	<b>Componentes das nano-emulsões</b> .....	<b>21</b>
<b>3.5.1.2</b>	<b>Métodos de obtenção</b> .....	<b>21</b>
<b>3.5.1.3</b>	<b>Fenômenos físico-químicos de quebra das nano-emulsões</b> .....	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
4.1	ÓLEO ESSENCIAL .....	24
4.2	MÉTODO DE NANOEMULSIFICAÇÃO .....	24
4.3	FATORES DE INFLUÊNCIA .....	25
4.4	CARACTERIZAÇÃO DAS NANO-EMULSÕES .....	25
<b>4.4.1</b>	<b>Aspectos macroscópicos</b> .....	25
<b>4.4.2</b>	<b>Análise do tamanho de partículas</b> .....	25
<b>4.4.3</b>	<b>Variação do tamanho de gotículas</b> .....	25
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>33</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>34</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo a Sociedade Brasileira de Farmacognosia (SBF) (2009), uma definição apropriada para essa importante área das ciências farmacêuticas indica que a farmacognosia “é a aplicação simultânea de várias disciplinas científicas com o objetivo de conhecer fármacos naturais sob todos os aspectos”. Além disso, a SBF indica que a farmacognosia “ciência multidisciplinar que contempla o estudo das propriedades físicas, químicas, bioquímicas e biológicas dos fármacos ou dos fármacos potenciais de origem natural assim como busca novos fármacos a partir de fontes naturais”, também sendo “interdisciplinar, fazendo interface com a botânica, etnobotânica, antropologia médica, biologia marinha, microbiologia, fitoquímica, fitoterapia, farmacologia, farmácia clínica, agronomia, entre outros”.

Os produtos naturais são a principal fonte de substâncias bioativas desde tempos remotos, sendo utilizados sob a forma de misturas complexas como extratos, frações purificadas, óleos essenciais, entre outras e até mesmo como ponto de partida para a geração de novas substâncias químicas. Nesse contexto, pesquisas diversas ao redor do mundo têm sido amplamente relacionadas à farmacognosia, como aquelas direcionadas à obtenção de medicamentos fitoterápicos, alimentos funcionais (nutracêuticos), fitocosméticos e controle de pragas, sejam elas de interesse econômico pelos possíveis danos a lavouras e até mesmo produtos estocados.

Sistemas nanoestruturados contendo substâncias de origem natural como constituintes da fase interna e dispersos em uma fase externa aquosa podem aumentar a estabilidade das substâncias, melhorar a disponibilização dessas em água e até mesmo promover uma liberação modificada, sendo essas características intimamente ligadas ao tamanho diminuto. Dentre esses, encontram-se as chamadas nano-emulsões aquosas ou nano-emulsões do tipo óleo em água. Elas são sistemas termodinamicamente instáveis em que gotículas esféricas de pequeno diâmetro encontram-se dispersas em um líquido imiscível, usualmente água ou soluções aquosas. São normalmente estabilizadas por tensoativos, que possuem papel preponderante na sua geração e estabilização. A estabilidade cinética é uma característica chave das nano-emulsões e grande responsável pela longa manutenção das suas características.

Utilizando-se conhecimentos relacionados às características químicas e aspectos físico-químicos dos constituintes da fase interna, é possível obter nano-emulsões por métodos de baixo aporte de energia, seja por métodos de inversão de fases ou auto-nano-emulsificação. Embora vários limites máximos de diâmetro sejam descritos para definir uma nano-emulsão,

usualmente entre 100-500 nm, o mais importante é que o sistema apresente uma funcionalidade que o torne diferente do material não nano-emulsificado.

As bases teóricas da formação e estabilização de nano-emulsões foram estabelecidas em sistemas consideravelmente mais simples do que aqueles obtidos com produtos naturais. Apesar da baixa solubilidade em água intrínseca de substâncias de origem natural presentes em óleos essenciais, torna-se um grande desafio compreender os fenômenos envolvidos quando observados os paradoxos envolvidos na estabilização de sistemas oleosos relativamente mais hidrofílicos como os óleos essenciais.

Variações na composição química de quimiotipos de uma mesma espécie podem afetar as propriedades físico-químicas do sistema, surgindo o questionamento acerca da possibilidade de se obter nano-emulsões por um método padrão com tensoativo não iônico mais hidrofílico. Portanto, a observação dos sistemas obtidos com os diferentes quimiotipos, ricos em substâncias de solubilidade em água diferenciada, auxiliaria na racionalização do delineamento de formulações a base de óleos essenciais, como escolha dos tensoativos, ordem de adição de fases, entre outros fatores.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a formação e estabilização de nano-emulsões à base de óleos essenciais presentes em diferentes quimiotipos de *Lippia alba*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Nano-emulsificar os óleos essenciais de *L. alba* utilizando-se tensoativo não iônico e glicerina;
- Avaliar a ordem de adição das fases na geração e estabilização das nano-emulsões;
- Caracterizar os sistemas nano-emulsionados formados;
- Avaliar a influência do tempo sobre as nano-emulsões;
- Interpretar os processos de geração e estabilização das nano-emulsões em função de propriedades físico-químicas dos componentes dos distintos óleos essenciais.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

As propriedades medicinais dos óleos essenciais de espécies vegetais aromáticas são conhecidas desde a antiguidade. Na medicina tradicional, os óleos essenciais são usados para fins terapêuticos há milhares de anos. Nas últimas décadas, ganharam um interesse renovado em diversas áreas e atualmente, o uso de produtos naturais à base de óleos essenciais é uma alternativa quem vem sendo aplicado no mercado para diversas finalidades, isso se deve às características físico-químicas com alto valor agregado respeitando o meio ambiente que podem ser utilizados para o desenvolvimento de formulações inovadoras (PEREIRA et al., 2018).

De acordo com a 6ª edição da Farmacopeia Brasileira (2019), óleos essenciais ou voláteis são produtos obtidos de plantas, através de métodos físicos, que possuem como característica evaporar à temperatura ambiente, são predominantemente constituídos por misturas complexas de substâncias lipofílicas e voláteis de baixa massa molecular, que determinam suas propriedades odoríferas, sabor e apresentam-se isolados ou misturados entre si, concentrados, desterpenados ou retificados (BRASIL, 2019).

Os óleos essenciais são geralmente líquidos à temperatura ambiente, e constituem-se quimicamente principalmente por terpenos, terpenoides e fenilpropanoides. A classificação dos terpenos é baseada no número de átomos de carbono, resultado do número de unidades de isopreno presentes em sua estrutura. Assim, podem ser classificados podem como: hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) e tetraterpenos ( $C_{40}$ ). Os compostos terpênicos mais abundantes em óleos essenciais são os monoterpenos ( $C_{10}$ ) e os sesquiterpenos ( $C_{15}$ ) (PEREIRA et al., 2018; SHARMEEN et al., 2021).

Apresentam uma grande variedade de estruturas e podem ser compostos por diversas classes, incluindo álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, ésteres, cumarinas, óxidos, fenóis, furanos, lactonas, ácidos orgânicos, peróxidos e enxofres. Na mistura, estes compostos apresentam diferentes concentrações, no qual geralmente é encontrado um componente de maior teor que é chamado de majoritário, e os componentes de menor teor que são chamados de traços (SIMÕES; SPITZER, 2007).

São produtos naturais obtidos de diversas partes de plantas como folhas, flores, frutos, raízes e cascas e para sua extração podem ser utilizados diversos métodos, sendo a hidrodestilação, destilação por arraste a vapor e enfloração os métodos mais utilizados

tradicionalmente. A técnica de extração pode afetar significativamente as características químicas e o rendimento dos óleos essenciais obtidos (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Os óleos essenciais possuem diversas atividades biológicas como antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias e inseticidas, além disso, destacam-se por sua fragrância, assim, são muito utilizados em indústrias farmacêuticas, indústrias de perfumes e de cosméticos e na indústria alimentícia. Além disso, diversas espécies vegetais produtoras de óleos essenciais são utilizadas na medicina popular, entre outras propriedades, por seus efeitos calmantes, sedativo, anti-inflamatório e analgésico. Dentre elas está a espécie *Lippia alba* (NISHIJIMA et al., 2014; DE LIMA; LINS, 2020).

### 3.2 *Lippia alba*

A *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson, pertencente à família Verbenaceae, é um arbusto aromático, que pode alcançar até 2 metros de altura. Possui ramos finos e alongados, arqueados, de coloração esbranquiçada e quebradiços. Suas folhas são elípticas ou lanceoladas, ovadas de largura variável com ápice agudo a obtuso e borda serrada (**Figura 1**). Suas flores estão agrupadas em inflorescências capituliformes de corola violácea ou branca com fundo amarelo e eixo curto que apresentam diferentes tamanhos e fruto esquizocarpo (LORENZI; MATOS, 2002; FLORA DO BRASIL, 2022).

**Figura 1** – Espécie *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson.



Fonte: Flora do Brasil (2020).

É uma planta originária da América do Sul e nativa do Brasil, sendo amplamente distribuída em todo o território brasileiro, com distribuição geográfica nas regiões norte (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins), nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), centro-oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), sudeste (Espírito Santo, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro) e sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina). Tem domínios fitogeográficos nas regiões Amazônica, Cerrado, Caatinga, Pantanal, Pampa e Mata Atlântica (FLORA DO BRASIL, 2022).

No Brasil, devido à ampla utilização tradicional, há uma grande variedade de nomenclatura popular para esta espécie que varia de acordo com a região, assim, é reconhecida por diversos nomes populares entre elas erva-cidreira, cidreira, falsa-melissa, carmelitana, cidreira-brava, chá-de-tabuleiro, salva-do-brasil, alecrim selvagem, dentre outras (LORENZI; MATOS, 2002; DE LIMA; LINS, 2020).

A indicação terapêutica de *L. alba* consta no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira 2ª edição e sua utilização na literatura está descrita como antiespasmódico, antidispéptico, analgésico, calmante e sedativo (CARMONA et al., 2013; BRASIL, 2021). Devido aos seus constituintes ativos, dentre eles o óleo essencial, na fitoterapia, é utilizada na forma de chás, infuso, macerada, em compressas, banhos, inalação, xarope ou extratos alcoólico e hidroalcoólico para o tratamento de diversas doenças como asma, bronquites, gripes, resfriados e tosse. Além disso, é utilizada também como calmante e no tratamento de diarreias e disenterias, dores de estômago, indigestão e problemas intestinais (LORENZI; MATOS, 2002; CAMILLO, 2016; CARVALHO, 2016; DE LIMA; LINS, 2020; FERREIRA et al., 2020; BRASIL, 2021).

Além disso, a espécie *L. alba* apresenta grande potencial para serem empregadas nas indústrias farmacêuticas, aromáticas e de perfumes, podendo também ser promissora nas indústrias de químicos agrícolas. Isso se deve às suas inúmeras propriedades, dentre elas antifúngica, inseticida e repelente comprovadas em diversos estudos e que são atribuídas à sua variabilidade fitoquímica (DE LIMA; LINS, 2020).

### 3.3 VARIAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba*

As espécies do gênero *Lippia* são bastante conhecidas e estudadas por apresentar diferentes composições químicas. O aroma da erva-cidreira está relacionado principalmente aos

constituintes do óleo volátil. Muitos trabalhos científicos descrevem que o teor de seus componentes químicos podem variar de órgão para órgão devido à influência de fatores como a idade da planta, época de colheita, horário do dia, estações do ano, época de floração, fatores genéticos, local de cultivo, mudanças climáticas, período em que foi coletada e quantidade de água disponível (DE OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 2014).

Diversos estudos fitoquímicos determinaram que as substâncias presentes nos óleos essenciais das espécies de *L. alba* são variadas, sendo composto principalmente por dois tipos de compostos químicos, entre eles os terpenoides e fenilpropanoides (LINDE et al., 2016). Ferreira et al. (2020), realizaram a análise do óleo essencial das folhas de *L. alba*, o estudo conclui que existe uma grande variabilidade quantitativa e qualitativa na composição química da espécie apresentando diferentes porcentagens de citral, carvona, linalol e limoneno, o que justifica a classificação em distintos quimiotipos (FERREIRA et al., 2020).

Linde e colaboradores (2016) também sugerem a classificação em quimiotipos para o óleo essencial de *L. alba*, pois inúmeros fatores podem afetar a composição dos componentes do óleo, como fatores genéticos, além disso, os estímulos externos influenciam nas rotas biossintéticas de produção de metabólitos secundários ocasionando na biossíntese de compostos distintos para a mesma espécie (DE OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 2014; SILVA; LINHARES; DA SILVA, 2021).

*L. alba* é considerada uma excelente fonte de compostos bioativos presentes no óleo essencial, evidenciados por vários perfis fitoquímicos de seus óleos descritos na literatura, assim a análise química desta espécie é de fundamental importância. Estudos realizados por Silva et al. (2021), demonstraram que os quimiotipos mais citados na literatura para esta espécie são o citral, carvona-limoneno, citral-mirceno, carvona-citral, linalol e carvona.

Nas atividades apresentadas por seu óleo essencial, destaca-se uma potencial ação larvicida verificada contra espécies da família Culicidae em estudos realizados por Ferreira et al. (2020). Além disso, diversas pesquisas realizadas com óleos extraídos de diferentes quimiotipos da erva-cidreira demonstraram que este possui diversas atividades biológicas, das quais se destacam a atividade anti-inflamatória (HALDAR et al., 2012), atividade antioxidante (OLIVEIRA et al., 2018), atividade antifúngica (GEROMINI et al., 2015) e atividade antiespasmódica (BLANCO et al., 2013).

A composição química de cada quimiotipo de *L. alba* é responsável por suas atividades biológicas específicas, assim, quimiotipos como citral e carvona estão sendo cada vez mais estudados porque demonstraram ter uma ampla gama de propriedades bioativas que podem ser exploradas para aplicações farmacêuticas, cosméticas e alimentícias, além de terem potencial

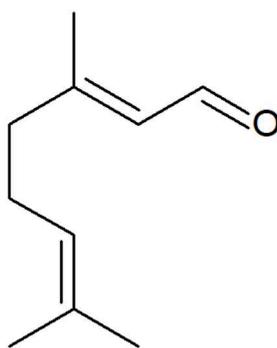
para serem utilizados como princípio ativo de novos produtos repelentes de insetos e inseticidas (CASTILLO; STASHENKO; DUQUE, 2017).

### 3.4 QUIMIOTIPOS DE *Lippia alba* ESTUDADOS

#### 3.4.1 Citral

O Citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal) (**Figura 2**) é um monoterpreno de fórmula molecular  $C_{10}H_{16}O$  e massa molar de 152,23 g/mol, o qual apresenta coloração amarelo pálido e odor fortemente cítrico, LogP de 3,17, ponto de ebulição 229 °C, densidade  $0,9\pm 0,1$  g/cm<sup>3</sup>, tensão superficial de  $27,1\pm 3,0$  dyne/cm e solubilidade em água de 84,71 mg/L (25 °C) (CHEMSPIDER, 2022b).

**Figura 2** – Estrutura química do Citral



Fonte: Autora (2023).

É um aldeído constituído pela mistura de dois isômeros geométricos (*cis*- isômero neral e *trans*- isômero geranial). Possui uma cadeia alifática de oito carbonos, com duas insaturações nos carbonos 2 e 6 e dois grupos substituintes metil nos carbonos 3 e 7 (NISHIJIMA et al., 2014).

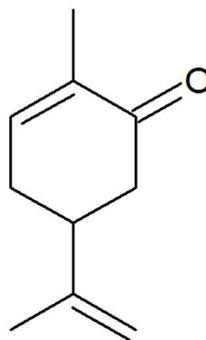
Esse quimiotipo é naturalmente encontrado nos óleos essenciais de várias espécies de plantas aromáticas como a *Lippia alba* (erva-cidreira), *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e *Litsea cubeba* (may chang) (FERREIRA, 2019; PEREIRA et al., 2021). Na indústria, é uma matéria prima de grande importância, sendo largamente utilizado na indústria alimentícia como aromatizante e na indústria de cosméticos e de perfumes na fabricação de aromas e fragrâncias, sendo responsável pelas notas cítricas (LU et al., 2018). A atividade repelente do quimiotipo citral também foi comprovada contra o mosquito *Aedes aegypti*, além disso, tem demonstrado

um notável potencial antibacteriano, antifúngico e anti-inflamatório (NISHIJIMA et al., 2014; LU et al., 2018; ADHIKARI et al., 2022).

### 3.4.2 Carvona

A carvona (2-metil-5-(metiletenil)-2-ciclohexen-1-ona) (**Figura 3**) é um monoterpreno do grupo das cetonas. Possui fórmula molecular  $C_{10}H_{14}O$  e massa molar de 150,22 g/mol, a qual apresenta coloração amarelo pálido e odor penetrante, LogP de 2,27, ponto de ebulição 230 °C, densidade  $0,9\pm 0,1$  g/cm<sup>3</sup>, tensão superficial de  $29,8\pm 3,0$  dyne/cm e solubilidade em água de 79,0 mg/L (20 °C) (CHEMSPIDER, 2022a).

**Figura 3** – Estrutura química do enantiômero (4R)-(-) carvona



Fonte: Autora (2023).

Quimicamente, devido a presença de um centro quiral, esse monoterpreno pode ser encontrado na natureza na forma de dois enantiômeros: (R)-(-)-carvona e (S)-(+)-carvona, que possuem aromas ligeiramente diferentes. O enantiômero *d*-carvona é um dos constituintes voláteis majoritários de várias plantas aromáticas e medicinais como a *Lippia alba* (erva-cidreira), *Mentha crispata* L. (hortelã) e *Poiretia latifolia* Vogel (erva-de-touro). É empregado por vários setores das indústrias, sendo utilizado na indústria alimentícia como aromatizante e em fragrância de perfumes, sabão e utilizado em bebidas (SILVA, 2011; SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2018).

Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* demonstram que esse quimiotipo possui atividades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitárias, anti-inflamatórias e antioxidantes (PINA et al., 2022). Além disso, as atividades inseticida e repelente contra o mosquito *Aedes aegypti* foi demonstrada em diversos trabalhos (CASTILLO; STASHENKO; DUQUE, 2017).

### 3.5 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é um campo de estudo multidisciplinar de grande interesse que está se destacando devido às suas diversas aplicações e vantagens. Tem sido alvo de diversos estudos e investimentos em diversas áreas científicas, apresentando um potencial promissor como estratégia tecnológica para o desenvolvimento de diversas formulações como medicamentos, cosméticos, na indústria de alimentos, entre outros (SANTOS et al., 2019).

Na nanotecnologia, os produtos naturais encontram grande destaque. Os óleos essenciais, por exemplo, apresentam características complexas como a baixa solubilidade em água e complexidade química, dificultando o desenvolvimento de formulações farmacêuticas, cosméticas e inseticidas eficazes e viáveis. Para contornar essas limitações é de fundamental importância o desenvolvimento de metodologias que preservem seus componentes bioativos, aumentando a estabilidade da formulação (BAJERSKI et al., 2016; SANTOS et al., 2019).

Dentro do campo da nanotecnologia, sistemas nanoestruturados como as nano-emulsões vêm despertando grande interesse do mercado, principalmente devido às suas propriedades físico-químicas. O tamanho diminuto das gotículas permite que as nano-emulsões sejam cineticamente estáveis, assim, apresentam uma variedade de aplicações na indústria farmacêutica, de cosméticos e na indústria alimentícia, podendo ser utilizada sob diversas formas farmacêuticas como aerossóis, cremes, espumas, géis ou sprays. Além disso, vêm se mostrando como uma estratégia promissora no controle de insetos (SHING et al., 2017; FERREIRA et al., 2020).

Quanto às vantagens das nano-emulsões, elas podem aumentar a biodisponibilidade de componentes lipofílicos bioativos, são pouco tóxicas e irritantes, melhoram a estabilidade física, devido ao tamanho reduzido de gotículas possuem maior área superficial proporcionando maior absorção, ajudam a solubilizar fármacos lipofílicos, e são úteis para mascarar o sabor. Outra vantagem do uso dessa técnica, é que a encapsulação permite, em alguns casos, aumentar o tempo de prateleira dos bioativos encapsulados, por meio da proteção contra oxidação e degradação (CODEVILLA et al., 2015; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; BAJERSKI et al., 2016).

Quanto aos produtos naturais, como aqueles presentes em óleos essenciais, a baixa miscibilidade em água torna a nanoemulsificação uma importante estratégia para aplicação desses compostos hidrofóbicos em meio aquoso, além de proteger contra perdas por volatilização (CODEVILLA et al., 2015; BAJERSKI et al., 2016). Diversos óleos essenciais e compostos voláteis isolados têm sido aplicados na preparação de nano-emulsões, tais como o

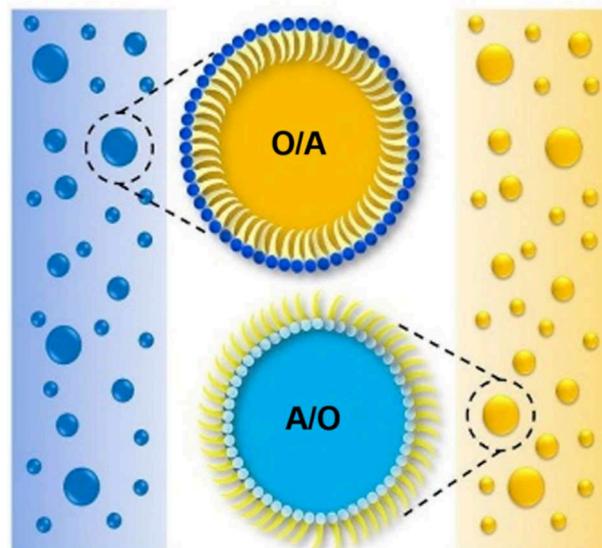
óleo de *Lippia alba* (FERREIRA, 2019), *Illicium verum* (FERNANDES et al., 2013), *Pectis elongata* (PEREIRA et al., 2021), *Rosmarinus officinalis* (FERNANDES et al., 2013), dentre outros.

### 3.5.1 Nano-emulsões

Segundo Singh et al. (2017) as nano-emulsões são caracterizadas por serem dispersões coloidais com tamanho de gotículas em escala nanométrica, apresentando diâmetro médio em torno de 20 a 500 nm. Devido ao tamanho diminuto das gotículas, apresentam-se com aspectos macroscópicos transparentes ou translúcidos (translúcido < 200 nm > leitosa) e reflexo azulado associado ao efeito Tyndall (MCCLEMENTS, 2012; SANTOS et al., 2019).

São constituídas por dois líquidos imiscíveis, na qual um deles denominado fase dispersa ou interna está disperso sob a forma de nanogotículas em outro líquido denominado de fase contínua ou externa (GUPTA et al., 2016; SING et al., 2017). Assim como as emulsões convencionais, podem ser do tipo óleo em água (O/A), água em óleo (A/O) ou múltiplas (A/O/A ou O/A/O) dependendo da fase dispersante ser hidrofílica ou lipofílica (**Figura 4**). Geralmente, a fase com maior volume transforma-se na fase contínua (MCCLEMENTS, 2012; LU et al., 2018).

**Figura 4** – Representação esquemática dos tipos de nano-emulsões.



Fonte: Adaptado de Singh et al., 2017.

### 3.5.1.1 Componentes das nano-emulsões

As nano-emulsões convencionais necessitam de pelo menos três componentes em suas formulações: uma fase orgânica ou oleosa, uma fase aquosa e um agente tensoativo ou uma mistura de tensoativos. Além disso, por serem sistemas termodinamicamente instáveis, é necessário o fornecimento de energia ao sistema para que ocorra a formação das nano-emulsões (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018).

A fase orgânica utilizada na formulação de nano-emulsões pode ser composta por vários compostos hidrofóbicos, incluindo óleos essenciais, óleos fixos, óleos vegetais como óleo de rícino e óleo de coco, vitaminas solúveis em óleo, fármacos, nutracêuticos, entre outros (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; MCCLEMENTS; JAFARI, 2018).

A fase aquosa por sua vez, normalmente é composta principalmente de água, mas também pode conter outros componentes que desempenham um papel importante, como glicerina, tampões, sais, co-solventes, conservantes, proteínas e carboidratos, entre outros (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; MCCLEMENTS; JAFARI, 2018).

Os tensoativos são moléculas orgânicas de natureza anfifílica, são compostos por uma região hidrofílica e uma região lipofílica denominadas cabeça e calda, respectivamente. Essa característica, permite sua aglomeração entre as fases onde a cabeça polar se projeta para a fase aquosa circundante e a calda apolar se projeta para o núcleo hidrofóbico composto pela fase oleosa e estabilizam as nano-emulsões impedindo a agregação das partículas através da redução da tensão interfacial entre as duas fases e evitando o aumento da viscosidade do sistema, facilitando a formação das nano-emulsões. Os tensoativos mais comuns empregados na indústria são os sintéticos e não iônicos como os polisorbatos e monoésteres de sorbitano (SOLANS; SOLÉ, 2012; GUPTA et al., 2016; SING et al., 2017; LU et., 2018).

### 3.5.1.2 Métodos de obtenção

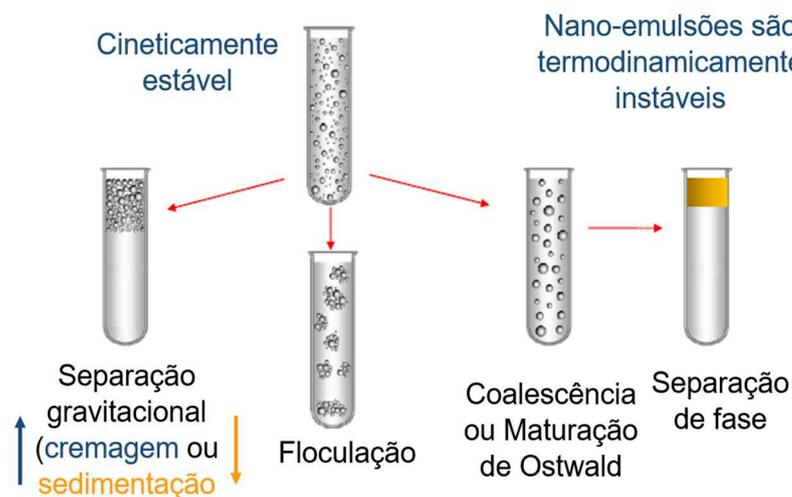
Segundo Solans e Solé (2012), para o preparo das nano-emulsões, podem ser utilizados métodos de baixo aporte de energia e métodos de alta energia. Os métodos de alta energia, fazem o uso de forças altamente suspensivas geradas por dispositivos específicos, como os geradores de ultrassom. Esses dispositivos criam forças de cisalhamento que permitem a redução do tamanho das gotículas em escala nanométrica. A sonificação, microfluidização e a homogeneização de alta pressão são os métodos mais utilizados (GUPTA et al., 2016; SINGH et al., 2017; PEREIRA et al., 2021).

Os métodos de baixa energia, por sua vez, utilizam a energia química do próprio sistema para a formação das nanogotículas e estão baseadas na formação espontânea de nano-emulsões. Quando comparados aos métodos de alta energia, produzem gotículas de menor tamanho e são uma ótima opção para encapsular moléculas com estruturas frágeis, visto que não são utilizadas energias mecânicas. Os métodos mais utilizados são os de temperatura de inversão de fases e emulsificação espontânea (GUPTA et al., 2016; SINGH et al., 2017; PEREIRA et al., 2021).

### 3.5.1.3 Fenômenos físico-químicos de quebra das nano-emulsões

McClements (2012) define as nano-emulsões como sistemas termodinamicamente instáveis e cineticamente estáveis por um longo período de tempo. Dessa forma, podem estar sujeitas a diversos fenômenos físico-químicos que afetam a estabilidade (**Figura 5**). Dentre esses fenômenos destacam-se a cremagem, sedimentação, floculação, coalescência e maturação de Ostwald (*Ostwald ripening*), que resultam na perda de estabilidade por meio da separação de fases.

**Figura 5** – Fenômenos físico-químicos de instabilidade das nano-emulsões.



Fonte: Adaptado de McClements; Jafari (2018).

A cremagem e sedimentação são fenômenos reversíveis, e ocorrem devido a diferença entre a densidade das fases. Enquanto no primeiro fenômeno ocorre a agregação de partículas na superfície da emulsão, no segundo, a agregação de partículas ocorre no fundo da nano-emulsão. A coalescência, por sua vez, é um fenômeno irreversível no qual ocorre a fusão das gotículas próximas devido ao rompimento da fina película existente entre elas, enquanto na

maturação de Ostwald, outro fenômeno irreversível, ocorre a fusão das gotículas menores nas maiores (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; GUPTA et al., 2016; MCCLEMENTS; JAFARI, 2018).

A maturação de Ostwald é o principal mecanismo de desestabilização de nano-emulsões. Esse fenômeno ocorre em sistemas polidispersos devido à diferença de solubilidade entre os diversos tamanhos de gotículas, o que faz com que as gotículas de menor tamanho migrem para o interior das gotículas maiores resultando no aumento do diâmetro médio dessas gotículas (SINGH et al., 2017; MCCLEMENTS; JAFARI, 2018).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

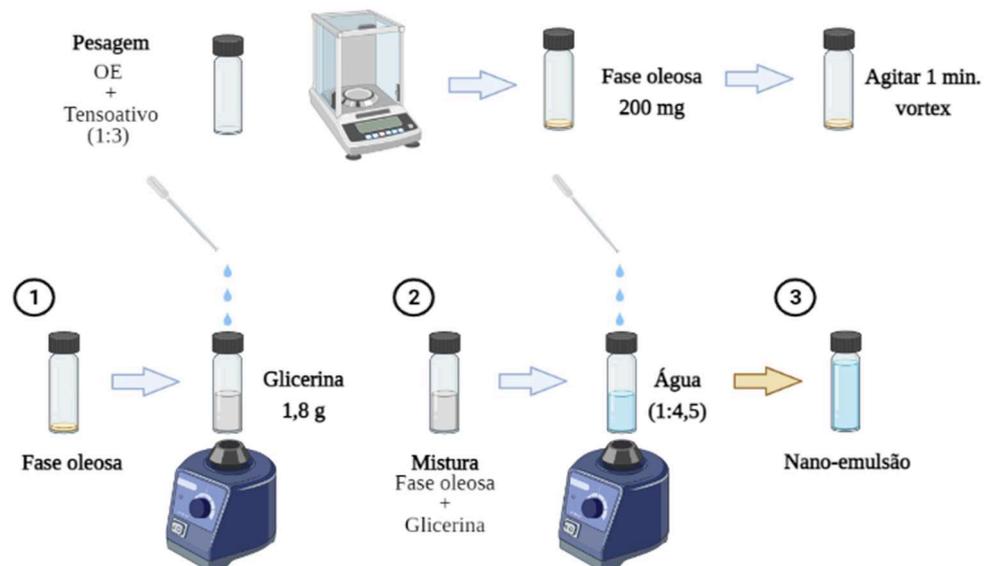
### 4.1 ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos essenciais (OEs) de diferentes quimiotipos de *L. alba* foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental (UFOPA). A técnica de hidrodestilação foi utilizada para obtenção dos OEs dos quimiotipos citral e carvona. As análises qualitativa e quantitativa dos constituintes dos OEs foram realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas e por cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização de chama, respectivamente.

### 4.2 MÉTODO DE NANOEMULSIFICAÇÃO

Para a obtenção das nano-emulsões foi utilizada uma abordagem de baixo aporte de energia, utilizando o método de emulsificação espontânea. Inicialmente, foram preparadas misturas constituídas por 10% (p/p) de fase oleosa (OEs de *L. alba* / polisorbato 20) e 90% (p/p) de fase dispersante (glicerina). A proporção entre OE/tensoativo foi de 1:3 e a fase oleosa foi adicionada gota a gota sobre a glicerina sob agitação vigorosa em um agitador do tipo vortex (Labor Import®). O sistema disperso obtido foi adicionado gota a gota sobre água destilada na proporção (1:4,5) sob agitação vigorosa em vortex (**Figura 6**).

**Figura 6** – Representação das etapas para obtenção das nano-emulsões.



Fonte: Desenhado pela autora na plataforma BioRender (2023).

### 4.3 FATORES DE INFLUÊNCIA

Foi variada a natureza do OE utilizado na nanoemulsificação através da utilização dos distintos quimiotipos de *L. alba* (citrinal e carvona). Dados de propriedades físico-químicas dos constituintes majoritários foram utilizadas para interpretação dos resultados (RAO; MCCLEMENTS, 2012).

### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANO-EMULSÕES

#### 4.4.1 Aspectos macroscópicos

Foram avaliadas características macroscópicas como cor, aspecto visual e opacidade após o preparo e após 24 h de armazenamento. A reflexo azulado produzido associado ao efeito Tyndall foi considerado indicativo da geração de nano-emulsão.

#### 4.4.2 Análise do tamanho de partículas

A análise de distribuição de tamanho de gotículas foi realizada por espalhamento dinâmico da luz, em um equipamento Zetasizer Malvern NanoZS. As medidas foram realizadas em triplicata e os gráficos interpretados em termos de diâmetro médio e índice de polidispersão. As leituras foram realizadas imediatamente após o preparo e após 24 h de armazenamento.

#### 4.4.3 Variação do tamanho de gotículas

O crescimento da gota (VG) foi determinado através da seguinte equação (GUTTOFF et al., 2015; LOBATO et al., 2020):

$$VG_{x,y} = 100 \times \frac{[tamanho\ médio\ (dy) - tamanho\ médio\ (dx)]}{tamanho\ médio\ (dx)}$$

Onde:

Dy= diâmetro médio do tamanho inicial

Dx= diâmetro médio do tamanho final

$DG_{y,x}$  = crescimento da gota após “dx” dias de armazenamento, quando comparado com o tamanho médio inicial de gotas no dia da preparação “dy”.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os óleos essenciais dos distintos quimiotipos de *L. alba* tiveram em torno de 91 % de suas composições químicas determinadas (**Tabela 1**). O quimiotipo citral teve a predominância de geranial e neral. Já o quimiotipo carvona teve a predominância desse monoterpene, seguido do 1,8-cineol e limoneno.

**Tabela 1** – Constituintes voláteis do óleo essencial de dois quimiotipos de *L. alba*.

Quimiotipos: *L. alba* 1 = citral; *L. alba* 2 = carvona

(continua)

Óleos essenciais			<i>L. alba</i> 1	<i>L. alba</i> 2
Rendimento			3,7%	1,1%
Constituintes	IR <sub>calc</sub>	IR <sub>lit</sub>	Abundância (%)	
$\alpha$ -pineno	932	932	-	0,56
Sabineno	972	969	-	3,74
6-metil-5-Hepten-2-ona	983	983	1,9	-
Mirceno	989	988	0,9	3,89
p-cymeno	1023	1020	0,77	-
<b>Limoneno</b>	1027	1024	<b>7,02</b>	<b>10,3</b>
<b>1,8-Cineol</b>	1030	1026	-	<b>14,37</b>
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno	1046	1044	0,53	0,96
$\gamma$ -terpineno	1057	1054	2,78	-
Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	1065	1065	-	0,52
Óxido de <i>cis</i> -linalool	1071	1067	-	-
Óxido de <i>trans</i> -linalool	1088	1084	-	-
Linalol	1104	1095	0,77	0,75
<i>endo</i> -fenchol	1106	1114	-	-
<i>trans</i> -verbenol	1143	1140	-	0,73
$\delta$ -terpineol	1165	1162	-	0,51
E-isocitral	1181	1177	0,63	-
$\alpha$ -terpineol	1189	1186	-	2,14
Mirtenol	1195	1194	-	0,69
$\beta$ -ciclocitral	1208	1217	-	-

**Tabela 1** – Constituintes voláteis do óleo essencial de dois quimiotipos de *L. alba*.Quimiotipos: *L. alba* 1 = citral; *L. alba* 2 = carvona

Óleos essenciais			(conclusão)	
			<i>L. alba</i> 1	<i>L. alba</i> 2
Rendimento			3,7%	1,1%
Constituintes	IR <sub>calc</sub>	IR <sub>lit</sub>	Abundância (%)	
Citronelol	1227	1223	1,17	-
<b>Neral</b>	1241	1235	<b>23,84</b>	-
<b>Carvona</b>	1243	1239	0,8	<b>30,72</b>
Geraniol	1253	1249	1,14	-
<b>Geranial</b>	1272	1264	<b>32,31</b>	-
Piperitenone	1339	1340	-	1,34
β-Cubebeno	1390	1387	-	0,58
β-Elemeno	1391	1389	0,64	0,79
<i>trans</i> -caryophyllene	1419	1417	0,58	-
γ-muuroleno	1481	1478	7,67	6,45
α-zingibereno	1494	1493	1,15	-
Cubebol	1514	1514	0,58	1,14
Elemol	1549	1548	5,39	5,21
Guaiol	1597	1600	-	0,53
Cedr-8(15)-en-9-α-ol	1650	1650	-	1,3
8-Cedren-13-ol	1696	1688	-	1,61
Curcumenol	1736	1733	-	0,6
Hidrocarbonetos monoterpênicos			12,0	19,97
Monoterpenos oxigenados			35,4	20,53
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos			10,0	7,82
Sesquiterpenos oxigenados			6,7	11,92
Ésteres			24,6	30,72
Outros			2,5	0
Total (%)			<b>91,3</b>	<b>91,0</b>

IR<sub>calc</sub> = Índice de retenção calculado; IR<sub>lit</sub> = Índice de retenção da literatura.

Fonte: Autora (2023).

Nano-emulsões são basicamente emulsões sub-micrônicas formadas por dois líquidos imiscíveis e estabilizados usualmente por tensoativos. Co-solventes podem ser adicionados à fase externa aquosa, quando o objetivo é gerar e estabilizar nano-emulsões do tipo óleo em água. Por exemplo, Saberi et al. (2013) investigaram o efeito da glicerina em nano-emulsões obtidas a base de glicerol preparadas por emulsificação espontânea (SABERI et al., 2013).

Alguns óleos essenciais, como de *Aniba duckei* e *Pimenta dioica* foram considerados imiscíveis em glicerol e portanto, ele poderia ser utilizado teoricamente para a obtenção de nano-emulsões (AZEVEDO, 2013). A utilização do óleo essencial na concentração de 2,5% (p/p) em glicerol levou a formação de mistura iridescente com gotículas perceptíveis do óleo essencial em escala macroscópicas. Além da presença de gotículas, após 24h ficou mais proeminente a separação das fases, especialmente para o quimiotipo citral, sugerindo a imiscibilidade dos quimiotipos estudados nesse solvente (**Figura 7**).

Através de análises macroscópicas, foi possível observar que os sistemas contendo glicerina apresentaram característica iridescente. No geral, as nano-emulsões preparadas com carvona e citral foram consideradas semelhantes, sendo observada uma ligeira maior transparência para o quimiotipo carvona após adição em água dos sistemas dispersos formados com glicerina. Nesse contexto, a glicerina foi utilizada como fase externa para a obtenção de sistemas dispersos iniciais que posteriormente foram diluídas para obtenção das nano-emulsões finais.

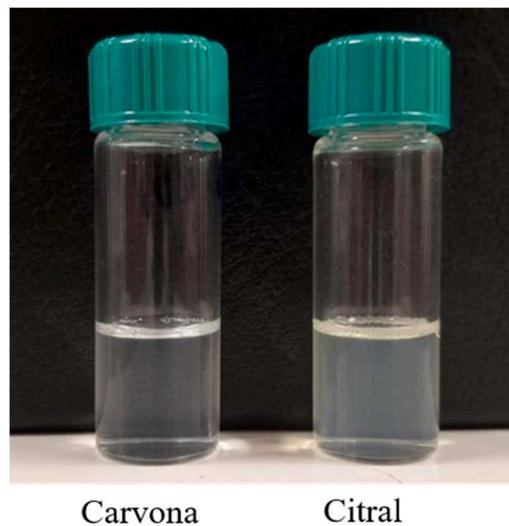
**Figura 7** – Misturas de *L. alba* quimiotipos carvona (esquerda) e citral (direita) e glicerina.



Fonte: Autora (2023).

Devido à maior transparência da nano-emulsão obtida com o quimiotipo carvona (**Figura 8**), ela pôde ser analisada por espalhamento dinâmico da luz sem diluição prévia. A análise da amostra concentrada indicou aumento de gotícula em torno de 160%, enquanto a análise da amostra diluída apresentou aumento de gotícula em torno de 65%. Já a nano-emulsão obtida com o quimiotipo citral necessitou de diluição, apresentando aumento de gotícula em torno de 20% após 24h.

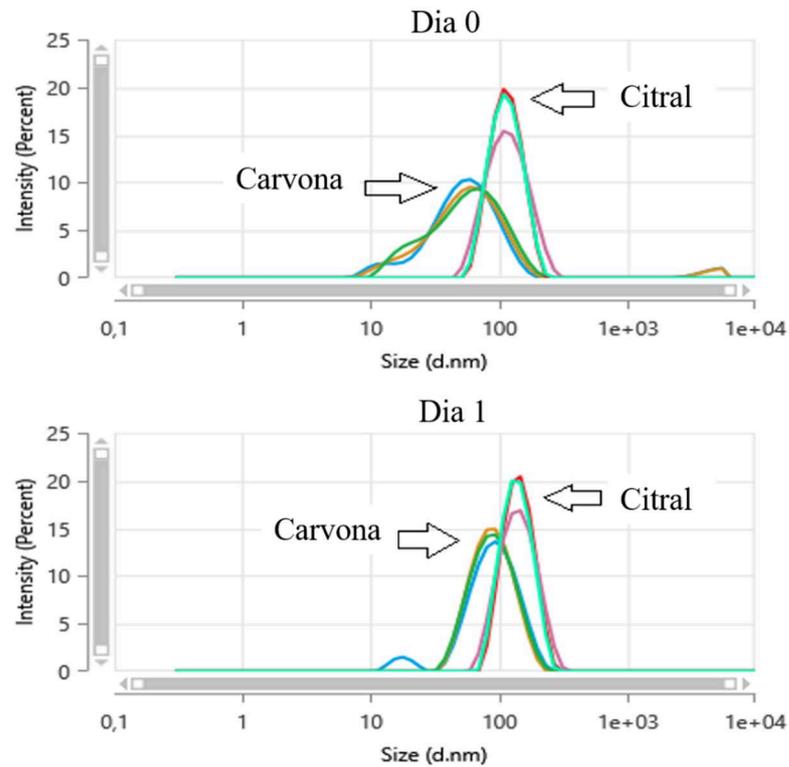
**Figura 8** – Nano-emulsões obtidas mediante adição de sistema disperso constituído por polisorbato 20/OE*L. alba*/glicerina em água.



Fonte: Autora (2023).

Embora uma menor tendência ao aumento do tamanho de gotícula tenha sido observada para o quimiotipo citral, o seu tamanho de gotícula foi 2,4 x maior no dia 0 e 1,7 x maior no dia 1 quando comparado ao quimiotipo carvona. Os gráficos de distribuição de tamanho de gotícula estão representados na figura 9 e foram obtidos através de medidas realizadas no dia do preparo das nano-emulsões (dia 0) e após 24h de armazenamento (dia 1).

**Figura 9** – Gráficos de distribuição de tamanho de gotícula das nano-emulsões preparadas com OEs de *L. alba*.



Fonte: Autora (2023).

A carvona (LogP 2,27 e solubilidade em água 79,0 mg/L) e o citral (LogP 3,17 e solubilidade em água 84,71 mg/L) podem ser considerados semelhantes em termos de propriedades físico-químicas. Ambos os óleos essenciais possuem também quantidades semelhantes de limoneno e alguns sesquiterpenos que podem atuar na estabilização das nano-emulsões por mecanismo de *Compositional ripening* (RAO; MCCLEMENTS, 2012).

O mecanismo de *Compositional ripening*, é um fenômeno que se opõe ao principal mecanismo de instabilidade de nano-emulsões, a maturação de Ostwald. Ambos os fenômenos modificam a evolução de uma nano-emulsão devido a diferenças de potencial químico entre gotículas que conduzem o movimento de um ou mais componentes da fase dispersa. Essa transferência entre gotículas é induzida por diferenças de composição de gotículas ou diferenças de tamanho de gotícula (pressão de Laplace) respectivamente (RAO; MCCLEMENTS, 2012; OTERO; MEEKER; CLEGG; 2018).

Assim, a presença de constituintes de baixa solubilidade em água como o limoneno, geranial e neral presentes em concentrações relativamente altas (>10%) podem ter inibido o crescimento das gotículas através de *Compositional ripening*. Isso ocorre porque à medida que

mais componentes solúveis em água se movem de gotas pequenas para grandes, impulsionadas por diferenças na curvatura das gotas, há uma mudança na composição das gotas, ou seja, as gotículas menores se tornam enriquecidas com componentes pouco solúveis em água, enquanto gotículas maiores se tornam enriquecidas com componentes altamente solúveis em água (RAO; MCCLEMENTS, 2012; OTERO; MEEKER; CLEGG, 2018).

No entanto, salienta-se que o 1,8-cineol está em uma concentração em torno de 14,4 % no quimiotipo carvona, podendo também ser considerado um constituinte majoritário desse óleo essencial. O seu valor de logP é 2,82 (CHEMSPIDER, 2023c) e portanto, pode ser responsável junto à carvona a uma possível maior miscibilidade em água do óleo essencial do quimiotipo carvona. Essa composição química pode estar contribuindo para o aumento do tamanho de gotícula da nano-emulsão à base do quimiotipo de carvona, somado ao fato de que o tamanho de gotícula menor desse sistema proporciona uma maior área superficial.

## 6 CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu uma investigação da geração, formação e estabilização de nano-emulsões à base de óleos essenciais de *Lippia alba*, com interpretação dos resultados em função das diferenças nos perfis fitoquímicos dos diferentes quimiotipos. Os resultados obtidos demonstraram que a composição do quimiotipo influencia a formação e a estabilidade da nano-emulsão. Sugere-se que a presença de componentes de baixa solubilidade em água podem inibir mecanismos de instabilidade como a maturação de Ostwald, podendo atuar na estabilização das nano-emulsões através do mecanismo de *Compositional ripening*. Além disso, a metodologia proposta neste trabalho se mostrou simples, de baixo custo e de fácil reprodutibilidade, portanto, abre perspectivas para a utilização de novas abordagens interessantes e ecologicamente corretas de baixo consumo de energia na nanoemulsificação de óleos essenciais.

## REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, K.; SARMA, R.; RABHA, B.; KHANIKOR, B. Repellent Activity of Citrus Essential Oils and Two Constituent Compounds Against *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, p. 1-8, 2022.
- AZEVEDO, G. R. **Avaliação dos parâmetros de solubilidade de Hansen do paracetamol e de óleos essenciais**. 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Maranhão, São Luís, 2013.
- BAJERSKI, L.; MICHELS, L. R.; COLOMÉ, L. M.; BENDER, E. A.; FREDDO, R. J.; BRUXEL, F.; HAAS, S. E. The use of Brazilian vegetable oils in nanoemulsions: an update on preparation and biological applications. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 347-363, 2016.
- BLANCO, M. A.; COLADERA, G. A.; BAREN, C. V.; BANDONI, A. L.; RINGUELET, J.; CONSOLINI, A. E. Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 149, n. 3, p. 803-809, 2013.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019.
- BRASIL. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. 2. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2021.
- CAMILLO, F. da C. *Lippia alba* (Mill.) NE Br. ex Britton & P. Wilson uma espécie nativa promissora para a introdução em programas nacionais de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 10, n. 4, p. 21-27, 2016.
- CARMONA, F.; ANGELUCCI, M. A.; SALES, D. S.; CHIARATTI, T. M.; HONORATO, F. B.; BIANCHI, R. V.; PEREIRA, A. M. S. *Lippia alba* (Mill) NE Brown hydroethanolic extract of the leaves is effective in the treatment of migraine in women. **Phytomedicine**, v. 20, n. 10, p. 947-950, 2013.
- CARVALHO, J. C. T. **Formulário Médico-Farmacêutico de Fitoterapia**. 4. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2016.
- CASTILLO, R. M.; STASHENKO, E.; DUQUE, J. E. Insecticidal and repellent activity of several plant-derived essential oils against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 33, n. 1, p. 25-35, 2017.
- CHEMSPIDER. **DL-carvone**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.21106424.html?rid=84b38d65-cd0e-4389-99b8-25e236c38f88>>. Acesso em: 21 nov. de 2022a.
- CHEMSPIDER. **Citral**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.8511.html?rid=c7420149-b1b6-4896-8e40-4bdbebda8511>>. Acesso em: 21 nov. de 2022b.

CHEMSPIDER. **Eucalyptol**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.8511.html?rid=c7420149-b1b6-4896-8e40-4bdbebda8511>>. Acesso em: 06 abr. de 2023c.

CODEVILLA, C. F.; BAZANA, M. T.; SILVA, C. de B da.; BARIN, J. S.; MENEZES, C. R. de. Nanoestruturas contendo compostos bioativos extraídos de plantas. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 5, p. 142-151, 2015.

DE LIMA, D. K. S.; LINS, S. R. de O. Avanços e novas descobertas sobre o uso de erva cidreira (*Lippia alba*) para inovação terapêutica na última década (2010-2020). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 87916-87934, 2020.

DE OLIVEIRA, J. L.; CAMPOS, E. V. R.; BAKSHI, M.; ABHILASH, P. C.; FRACETO, L. F. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: prospects and promises. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 8, p. 1550-1561, 2014.

DE OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia: Identificação de Drogas Vegetais**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2014.

DUARTE, J. L. et al. Self-nano-emulsification of chamomile essential oil: A novel approach for a high value phytochemical. **Colloid and Interface Science Communications**, v. 34, p. 100225, 2020.

FERNANDES, C. P.; MASCARENHAS, M. P.; ZIBETTI, F. M.; LIMA, B. G.; OLIVEIRA, R. P. R. F.; ROCHA, L.; FALCÃO, D. Q. HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 108-114, 2013.

FERREIRA, R. M. dos A. **Avaliação da atividade larvicida de nanoemulsões contendo óleos essenciais em *Aedes aegypti* Linnaeus e *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae)**. 2019. 124 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Tropical) – Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2019.

FERREIRA, R. M. dos A.; DUARTE, J. L.; CRUZ, R. A. S.; OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; ARAÚJO, R. S.; CARVALHO, J. C. T.; MOURÃO, R. H. V.; SOUTO, R. N. P.; FERNANDES, C. P. A herbal oil in water nano-emulsion prepared through an ecofriendly approach affects two tropical disease vectors. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p. 778-784, 2020.

GEROMINI, K. V. N.; RORATTO, F. B.; FERREIRA, F. G.; CAMILOTTI, J.; VIDIGAL, T. M. A.; VALLE, J. S.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Fungicidal effect of *Lippia alba* essential oil on a white-rot fungus. **Maderas. Ciencia y tecnología**, v. 17, n. 1, p. 29-38, 2015.

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.

- GUTTOFF, M.; SABERI, A. H.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: factors affecting particle size and stability. **Food chemistry**, v. 171, p. 117-122, 2015.
- HALDAR, S.; BISWAKANTH, K.; DOLAI, N.; KUMAR, R. B. S.; BISWARANJAN, B.; HALDAR, P. K. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Lippia alba*. **Asian pacific journal of tropical disease**, v. 2, p. 667-670, 2012.
- JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123-127, 2015.
- KAH, M.; HOFMANN, T. Nanopesticide research: current trends and future priorities. **Environment international**, v. 63, p. 224-235, 2014.
- LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; ALBERTÓ, E.; GAZIM, Z. C. Quimiotipos, extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de *Lippia alba*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 191-200, 2016.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais do Brasil: Nativas e Exóticas**. 1. ed. 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.
- McCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft matter**, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012.
- McCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation. In: JAFARI, S. M.; McCLEMENTS, D. J. (Eds.). **Nanoemulsions: Formulation, Applications and Characterization**. Academic Press, p 3-20, 2018.
- NISHIJIMA, C. M.; GANEV, E. G.; MAZZARDO-MARTINS, L.; MARTINS, D. F.; ROCHA, L. R. M.; SANTOS, A. R. S.; HIRUMA-LIMA, C. A. Citral: a monoterpene with prophylactic and therapeutic anti-nociceptive effects in experimental models of acute and chronic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 736, p. 16-25, 2014.
- OLIVEIRA, G. T.; FERREIRA, J. M. S.; LIMA, W. G.; ALVES, L. F.; ALMEIDA, J. M. D.; LIMA, L. A. R. dos S. Phytochemical characterisation and bioprospection for antibacterial and antioxidant activities of *Lippia alba* Brown ex Britton & Wilson (Verbenaceae). **Natural product research**, v. 32, n. 6, p. 723-731, 2018.
- O QUE É FARMACOGNOSIA? **Sociedade Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, 2009. Disponível em: <<http://www.sbfgnosia.org.br/farmacognosia.html>>. Acesso em: 11 abr. de 2022.
- OTERO, J.; MEEKER, S.; CLEGG, P. S. Compositional ripening of particle-stabilized drops in a three-liquid system. **Soft Matter**, v. 14, n. 19, p. 3783-3790, 2018.

PEREIRA, I.; SEVERINO, P.; SANTOS, A. C.; SILVA, A. M.; SOUTO, E. B. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, p. 566-578, 2018.

PEREIRA, S. F.; BARROSO, A.; MOURÃO, R. H. V.; FERNANDES, C. P. A Low Energy Approach for the Preparation of Nano-Emulsions with a High Citral-Content Essential Oil. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3666, 2021.

PINA, L. T. S.; SERAFINI, M. R.; OLIVEIRA, M. A.; SAMPAIO, L. A.; GUIMARÃES, J. O.; GUIMARÃES, A. G. Carvone and its pharmacological activities: A systematic review. **Phytochemistry**, v. 196, p. 113080, 2022.

RAO, J.; McCLEMENTS, D. J. Impact of lemon oil composition on formation and stability of model food and beverage emulsions. **Food chemistry**, v. 134, n. 2, p. 749-757, 2012.

SABERI, A. H.; FANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Effect of glycerol on formation, stability, and properties of vitamin-E enriched nanoemulsions produced using spontaneous emulsification. **Journal of colloid and interface science**, v. 411, p. 105-113, 2013.

SALIMENA, F. R. G.; CARDOSO, P. H. *Lippia in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB15171>>. Acesso em: 20 abr. 2022.

SANTOS, A. C.; MORAIS, F.; SIMÕES, A.; PEREIRA, I.; SEQUEIRA, J. A. D.; SILVA, M. P.; VEIGA, F.; RIBEIRO, A. Nanotechnology for the development of new cosmetic formulations. **Expert opinion on drug delivery**, v. 16, n. 4, p. 313-330, 2019.

SHARMEEN, J. B.; MAHOMOODALLY, F. M.; RICO, G.; MAGGI, F. Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 666, 2021.

SILVA, G. B. da. **Isolamento, caracterização, quantificação e avaliação da pureza enantiomérica de linalol, carvona e limoneno em óleos essenciais de espécies aromáticas**. 2011. 120 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2011

SILVA, R. S.; LINHARES, J. F. P.; DA SILVA, A. C. Componentes majoritários de óleos essenciais, partes usadas e fenofases de *Lippia alba*: uma revisão. **International Journal of Development Research**, v. 11, n. 02, p. 44556-44560, 2021.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, E. V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVIK, P. R. (Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora UFRGS/ Editora UFSC, p. 467-495, 2007.

SINGH, Y.; MEHER, J. G.; RAVAL, K.; KHAN, F. A.; CHAURASIA, M.; JAIN, N. K.; CHOURASIA, M. K. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of controlled release**, v. 252, p. 28-49, 2017.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: formation by low-energy methods. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 17, n. 5, p. 246-254, 2012.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; SNYDER, S. A. **Química Orgânica**: volume 1. 12. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2018.