



Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação



Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical

Mestrado e Doutorado

UNIFAP / EMBRAPA-AP / IEPA / CI-Brasil

JÉSSICA ALVES DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE NANODISPERSÕES À BASE DE FOLHAS DE
PARIRI (*Fridericia chica* (Bonpl.) L. G. Lohmann)

MACAPÁ, AP

2017

JÉSSICA ALVES DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE NANODISPERSÕES À BASE DE FOLHAS DE PARIRI

(*Fridericia chica* (Bonpl.) L. G. Lohmann)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO) da Universidade Federal do Amapá, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Orientador: Dr. Caio Pinho Fernandes

Co-Orientadora: Dra. Regina Gendzelevski Kelmann.

MACAPÁ, AP

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

620.4

S586d Silva, Jéssica Alves da.

Desenvolvimento de nanodispersões à base de folhas de pariri (Fridericia chica (Bonpl.) L. G. Lohmann) / Jéssica Alves da Silva; orientador, Caio Pinho Fernandes; coorientadora, Regina Gendzelevski Kelmann. – Macapá, 2017.

47 f.

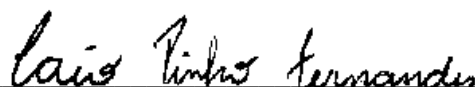
Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical.

1. Nanotecnologia. 2. *Arrabidaea chica*. 3. Extração sem solvente orgânico. I. Fernandes, Caio Pinho, orientador. II. Kelmann, Regina Gendzelevski, coorientadora. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

JÉSSICA ALVES DA SILVA

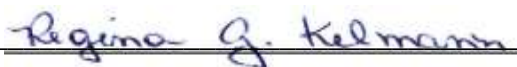
DESENVOLVIMENTO DE NANODISPERSÕES À BASE DE FOLHAS DE PARIRI

(*Fridericia chica* (Bonpl.) L. G. Lohmann)



Dr. Caio Pinho Fernandes

Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)



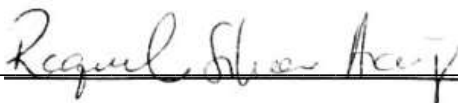
Dra. Regina Gendzelevski Kelmman

Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)



Dr. José Carlos Tavares Carvalho

Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)



Dra. Raquel Silva Araújo

Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)

Aprovada em 22 de fevereiro de 2017, Macapá, AP, Brasil

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me guiado e iluminado durante toda minha existência, sempre me mostrando o lado bom da vida e me dando forças, amor, proteção, esperança, discernimento e coragem.

A cada professor que tive na vida, pois cada um deles somou para este momento e me ajudou a ser quem sou hoje. Aprendi muito com cada um, em vários aspectos. Obrigada por terem se doado e transmitido conhecimentos e lições para a vida toda.

A meus orientadores, Caio Pinho Fernandes e Regina Gendzelevski Kelmann, por terem despendido tempo para acompanhar o desenvolvimento deste trabalho, pela orientação em geral, pela paciência e pela compreensão.

A todos os membros do Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica e do Laboratório de Pesquisa em Fármacos, ambos da Universidade Federal do Amapá, pois a colaboração desses foi imprescindível para que eu pudesse executar os experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado, sem a qual se tornaria inviável minha permanência nesse programa de Pós-Graduação.

Às demais pessoas que me ajudaram durante o mestrado, especialmente à turma de mestrado PPGGIO 2015. E a todos que de alguma maneira contribuíram para meu crescimento pessoal e acadêmico.

RESUMO

Silva, Jéssica. Desenvolvimento de nanodispersões à base de folhas de pariri (*Fridericia chica* (Bonpl.) L. G. Lohmann). Macapá, 2017. Dissertação (Mestre em Biodiversidade Tropical) – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá.

Diversas espécies vegetais possuem potencial para serem utilizadas no desenvolvimento de produtos inovadores, como é o caso de *Fridericia chica* (Bonpl.) L. G. Lohmann, amplamente utilizada pela medicina popular para tratar doenças como anemia, infecções e úlceras. Nanodispersões de substâncias oriundas de plantas são uma das estratégias emergentes para o aproveitamento de matéria-primas vegetais, entretanto, seu desenvolvimento ainda enfrenta obstáculos, como o uso de solventes orgânicos, que são correlacionados com problemas de saúde humana e ambiental e aumentam custos de processo. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método simples e rápido de obtenção de nanodispersões à base de folhas de *Fridericia chica*, sem o uso de solventes orgânicos e por método de baixo aporte de energia. Avaliou-se a influência de diferentes proporções de tensoativos não iônicos durante a etapa de extração. Posteriormente, analisou-se o comportamento do sistema nanodisperso após diluição em meios aquosos distintos. As formulações obtidas foram caracterizadas por tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e absorvância no UV/VIS. Avaliou-se a eficácia do método em obter nanodispersões bioativas através de teste de inibição de crescimento de fungos do gênero *Candida*. Os resultados mostraram que o método foi capaz de gerar formulações com tamanho de partícula entre 120 – 300 nm, índice de polidispersão entre 0,150 – 0,500, potencial zeta entre -16 – (-34) mV e que a diluição em água foi favorável à manutenção das características desejadas. A nanodispersão otimizada (preparada com solução aquosa de tensoativos com EHL 8) inibiu o crescimento de *C. albicans* e *C. glabrata*, porém não inibiu significativamente o crescimento de *C. tropicalis*. Os resultados sugerem que é possível obter nanodispersões bioativas simultaneamente a extração de metabólitos secundários obtidos de partes de plantas e sem o uso de solventes orgânicos.

Palavras-chave: *Arrabidaea chica*; atividade antifúngica; método sem solvente orgânico; sistemas nanoestruturados.

ABSTRACT

Silva, Jéssica. Development of nanodispersions based on pariri leaves (*Fridericia chica* (Bonpl.) L. G. Lohmann). Macapá, 2017. Dissertação (Mestre em Biodiversidade Tropical) – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá.

Several botanical species have potential to development of innovative products, such *Fridericia chica* (Bonpl.) L. G. Lohmann, which is widely used on folk medicine, such as anemia, infections and ulcers. Nanodispersions that contain natural products from plants are an emerging strategy for exploitation of natural raw materials. However, technological challenges must be solved. Among them, we can include the utilization of organic solvents that are responsible by human health and environment problems. Thus, a removing step should be required, increasing the costs of the process. The aim of the presente study was to develop a simple and rapid method for obtainment of nanodispersions containing leaves of *Fridericia chica*, without utilization of organic solvente and by a low energy method. It was evaluated influence of diferente ratios of a pair of non-ionic surfactants. Evaluation of nanodispersion dilution with diferente aqueous media was also performed. The formulations were characterized according to particle size, polydispersity index, zeta potential and absorption on UV-VIS. Inhibition assay on some *Candida* species was also performed. The results showed that the method was able to generate formulations with particle size between 120 – 300 nm, polydispersity index between 0.150 – 0.500, zeta potential between -16 – (- 34) mV and the dilution maintainde the desirable characteristics. The optimized nanodispersion (prepared with aqueous solution of surfactants at HLB value of 8) inhibited *C. albicans* and *C. glabrata* growth, but did not significantly inhibit the growth of *C. tropicalis*. Therefore, our results suggest that it is possible to obtain bioactives nanodispersions during the extraction based on secondary metabolites from plant origin.

Keywords: *Arrabidaea chica*; antifungal activity; organic solvent-free method; nanostructured system.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	8
1. 1. PRODUTOS NATURAIS.....	8
1.2. <i>Fridericia chica</i> (Bonpl.) L. G. Lohmann.....	9
1.2.1. Constituição química	10
1.2.2. Propriedades farmacológicas e biológicas	12
1.3. NANODISPERSÕES	15
2. HIPÓTESES.....	17
3. OBJETIVOS	18
3. 1. GERAL.....	18
3. 2. ESPECÍFICOS.....	18
4. REFERÊNCIAS	19
5. ARTIGO CIENTÍFICO	24
6. CONCLUSÕES	46
ANEXO 1. CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO.....	47

1. INTRODUÇÃO GERAL

1. 1. PRODUTOS NATURAIS

As plantas interagem com o meio ambiente ao seu redor através de produtos naturais, também chamados de metabólitos secundários, por serem sintetizados por seu metabolismo secundário. Essas substâncias constituem uma verdadeira interface química entre as plantas e o ambiente circundante, sendo decisivos para sua adaptação (Santos 2010). Os produtos naturais realizam diversas funções para as plantas, principalmente atuando na proteção e na reprodução do vegetal (Kutchan 2001). Por exemplo, metabólitos secundários podem proteger de raios ultravioleta (Demming-Adams 1900), repelir formigas para proteção da planta frente à herbivoria exacerbada (Junker et al. 2011) e atrair insetos polinizadores (Filella et al. 2011).

Apesar do viés ecológico, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de avaliar as diferentes atividades biológicas dos metabólitos secundários. Eles têm sido historicamente utilizados pelo ser humano para diferentes finalidades, como, para melhorar o sistema imunológico de indivíduos saudáveis, portadores de HIV (síndrome da imunodeficiência adquirida) ou CFS (síndrome da fadiga crônica) (See et al. 1997), inseticidas (Enan 2001), hipoglicemiantes (Grover et al. 2002), controle biológico de pragas na agricultura (Coppler et al. 2007), combate a larvas de insetos transmissores de doenças ao ser humano (Oliveira et al. 2016), dentre outros.

Os metabólitos secundários são agrupados em classes, dentre as quais podemos citar os terpenoides, alcaloides, esteroides, saponinas, cromonas, xantonas e polifenólicos (Simões et al. 2010). Os flavonoides são uma das classes mais importantes e diversificadas de produtos naturais polifenólicos. Essas substâncias são caracterizadas quimicamente pela presença de um anel central benzo- γ -pirona, contendo hidroxilas fenólicas que podem se apresentar ligadas a açúcares (formando glicosídeos), metoxiladas ou outros tipos de substituição (Medic-Saric 2008). Os flavonoides são biossintetizados a partir da combinação da via do chiquimato e da via do acetato (Dewick 2002). A classe dos flavonoides é geralmente subdividida em flavonas, flavonóis, flavonoides C-heterosídeos, antocianos, chalconas, auronas, di-hidroflavonoides, flavanas, antocianidinas, isoflavonoides, neoflavonoides e biflavonoides (Zuanazzi and Montanha 2010).

Os flavonoides geralmente conferem cor às flores, frutos e folhas de plantas, tornando-as atrativas para polinizadores e dispersores de sementes (Seitz et al. 2006). Os flavonoides também podem proteger as plantas de raios ultravioleta (Koes et al. 2005, Winkel-Shirley 2002), de invasões de microrganismos, de insetos e mamíferos herbívoros (Harborne and

Williams 2000). Além disso, várias espécies vegetais ricas nessas substâncias possuem enorme potencial para serem utilizadas no desenvolvimento de produtos que podem atuar como protetores solares (Siraichi et al. 2013b), antioxidantes (Saeed et al. 2012), potenciais efeitos anti-inflamatórios (Chen et al. 2017), cicatrizantes (Jorge et al 2008), antimicrobianos (Mafioleti et al. 2013) e antifúngicos (Hofling et al. 2010), dentre outros.

1.2. *Fridericia chica* (Bonpl.) L. G. Lohmann

Fridericia chica (Bonpl.) L. G. Lohmann é uma espécie vegetal de clima quente, pertencente à família botânica Bignoniaceae. A família Bignoniaceae possui 21 gêneros e 393 espécies, sendo que 67 pertencem ao gênero *Fridericia* Mart. A espécie *F. chica* tem como sinônimos homotípicos *Arrabidaea chica* (Bonpl.) Verl. e *Lundia chica* (Bonpl.) Seem (Lohmann and Taylor 2014). É uma liana encontrada em todas as regiões do Brasil, adaptando-se aos biomas amazônico, caatinga, cerrado, mata atlântica, pampa e pantanal (Forzza et al. 2010). Essa planta é conhecida popularmente no Brasil como Carajuru, Chica, Cipó-cruz, Crajiru, Guajuru-piranga, Oajuru-piranga, Paripari, Pariri e em outros países como Puca, Panga, Cricket-vine, Crejer, Crejeru e Masipaká.

Foi descrita por Humboldt and Bonpland (1808) como sendo uma planta de hastes lisas e ramificadas, com estrutura foliar bipinada, bifoliada e de folhas opostas, de margem inteira e com folíolos glabros, possuindo gavinha na extremidade dos pecíolos parciais, com corola bilabiada e de cor violeta, estames didínamos e inflorescência do tipo panícula (Figura 1). *F. chica* era tradicionalmente utilizada pelos indígenas para fabricar um corante vermelho, além de ser utilizada como diurético pelos espanhóis (Humboldt and Bonpland 1808).

Os folíolos de *F. chica* se adaptam à idade e ao meio no qual se encontram, podendo ser lanceolados ou ovais. Os espécimes possuem folíolos lanceolados quando cultivados e quando plântulas, mesmo crescendo livremente na natureza. A crescerem como lianas na natureza seus folíolos tendem a ser ovais. Essa mudança na morfologia das folhas gera divergências de identificação entre os pesquisadores.

Atualmente, exemplares dessa espécie podem ser encontrados em muitos países, como Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Caribe, Colômbia, Equador, El Salvador, Guatemala, Guiana Francesa, Honduras, México, Nicarágua, Panamá e Venezuela (Bieski et al. 2015). Devido a sua capacidade de adaptação e ampla abrangência geográfica, o pariri se torna uma promissora planta para ser estudada.



Figura 1 – Prancha do basiônimo *Bignonia chica* Bonpl.

Fonte: Humboldt and Bonpland (1808).

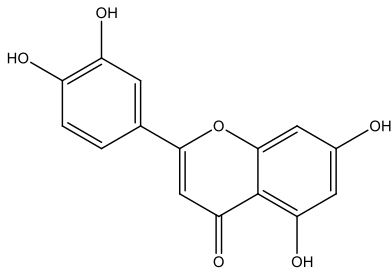
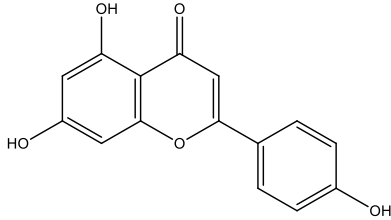
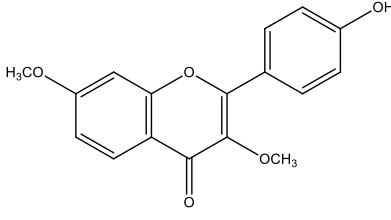
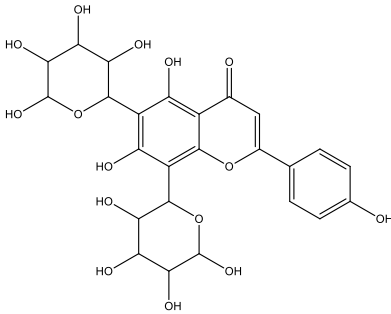
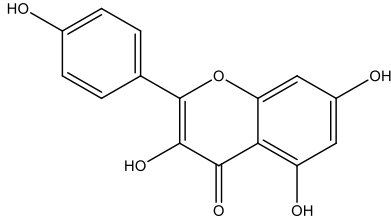
1.2.1. Constituição química

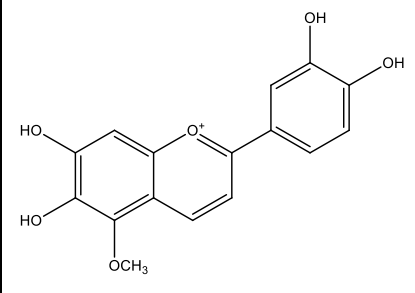
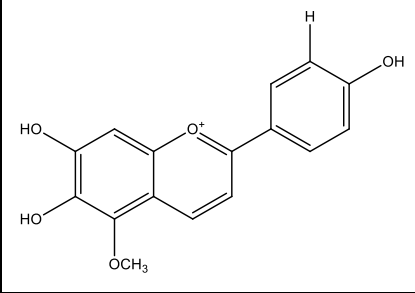
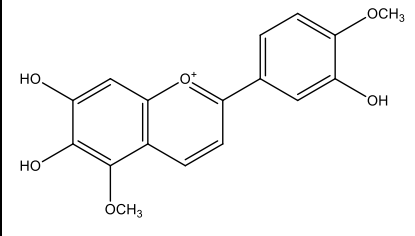
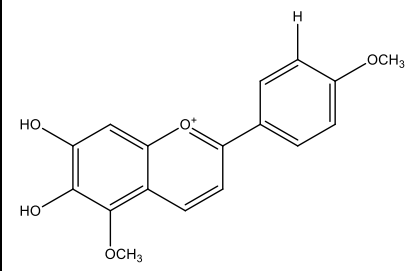
F. chica possui antocianinas (Barbosa et al. 2008, Alves et al. 2010, Mafioleti et al. 2013), antocianidinas (Zorn et al. 2001, Devia et al. 2002, Barbosa et al. 2008, Alves et al. 2010, Cortez de Sá et al. 2016), antraquinonas (Barbosa et al. 2008, Alves et al. 2010), alcaloides (Alves et al. 2010, Santos et al. 2013), catequinas (Barbosa et al. 2008, Alves et al. 2010), chalconas (Cortez de Sá et al. 2016), ácidos orgânicos (Barbosa et al. 2008), açúcares redutores (Barbosa et al. 2008, Alves et al. 2010), esteroides (Barbosa et al. 2008, Alves et al. 2010, Brandão et al. 2010), quinonas (Medeiros et al. 2011), xantonas (Barbosa et al. 2008), flavanonóis (Barbosa et al. 2008, Alves et al. 2010), flavanonas (Barbosa et al. 2008, Alves et al. 2010, Mafioleti et al. 2013), flavonas (Mafioleti et al. 2013, Siraichi et al. 2013a), taninos (Barbosa et al. 2008, Alves et al. 2010, Cortez de Sá et al. 2016), saponinas (Alves et al. 2010, Santos et al. 2013), triterpenos (Brandão et al. 2010).

A coloração típica que se obtém das folhas secas de *F. chica* é devido principalmente à presença de quatro 3-desoxiantocianidinas: carajurina e carajurona conferem a tonalidade amarelo alaranjado, enquanto que 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxi-flavilio e 6,7,3'-trihidroxi-

5,4'-dimetoxi-flavílio são responsáveis pela cor vermelha (Zorn et al. 2001, Devia et al. 2002). As substâncias que já foram isoladas das folhas de *F. chica* encontram-se reunidas no Quadro 1.

Quadro 1 – Estrutura das substâncias isoladas das folhas de *F. chica*.

Classe	Substância	Estrutura	Fonte
Flavona	Luteolina (5,7,3',4'-tetrahidroxi-flavona)		Takemura et al. 1995; Amaral et al. 2012.
Flavona	Apigenina (4',5,7-Trihidroxiflavona)		Amaral et al. 2012; Siraichi et al. 2013a.
Flavona	4'-hidroxi-3,7-dimetoxi-flavona		Barbosa et al. 2008.
Flavonoide C-Glicosídeo	Vicenina-2		Barbosa et al. 2008.
Flavonol	Campferol (3,4',5,7-tetrahidroxiflavona)		Barbosa et al. 2008.

Antocianidina	6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxi-flavílio		Takemura et al. 1995; Zorn et al. 2001; Devia et al. 2002; Servat-Medina et al. 2015.
Antocianidina	Carajurona (6,7,4'-trihidroxi-5-metoxiflavílio)		Zorn et al. 2001; Devia et al. 2002; Servat-Medina et al. 2015.
Antocianidina	6,7,3'-trihidroxi-5,4'-dimetoxi-flavílio		Zorn et al. 2001.
Antocianidina	Carajurina (6,7-dihidroxi -5,4'-dimetoxi-flavílio)		Zorn et al. 2001; Devia et al. 2002; Servat-Medina et al. 2015.

Além de metabólitos secundários, estão presentes quantidades significativas de minerais em suas folhas, como cálcio (Martins et al. 2009), magnésio (Magalhães et al. 2009, Martins et al. 2009) e ferro (Magalhães et al. 2009, Martins et al. 2009), que são preservados no chá. Zinco e cobre podem ser encontrados, dependendo do local de coleta, tendo grande variabilidade de concentração (Magalhães et al. 2009, Martins et al. 2009).

1.2.2. Propriedades farmacológicas e biológicas

As folhas e hastes de *F. chica* são empregadas na medicina popular, incluindo a amazônica, para diversos usos, incluindo tratamento de anemia (Silva et al. 2007, Madaleno 2010), anti-inflamatório (Evangelista et al. 2013), antisséptico (Madaleno 2010), catapora (Odone et al. 2013), feridas cutâneas (Biavatti et al. 2007, Jorge et al. 2008, Odone et al.

2013) , infecções oculares (Lentz 1993, Lentz et al. 1998), nos ovários, na bexiga e nos rins, câncer, cólicas menstruais, dores renais, como depurativos do sangue, febre, indisposição, inflamação do útero, reumatismo (Coelho-Ferreira 2009, Bieski et al. 2015), úlcera (Biavatti et al. 2007, Madaleno 2010) e sarampo (Odone et al. 2013).

O extrato bruto obtido pela extração das folhas e hastes de *F. chica* com solução de metanol, etanol, água destilada e ácido clorídrico apresenta atividade antioxidante, mostrando valores de TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox) maiores do que outras plantas ricas em substâncias antioxidantes, como morango, framboesa, repolho roxo e brócolis (Silva et al. 2007). A atividade antioxidante observada foi correlacionada à concentração de flavonoides e substâncias fenólicas (Silva et al. 2007). Outros trabalhos também relataram ação antioxidante de extratos de pariri (Jorge et al. 2008, Port's et al. 2013, Santos et al. 2013). O extrato bruto hidroetanólico das folhas possui maior atividade antioxidante do que suas flavonas escutelarina e apigenina isoladas (Siraichi et al. 2013a).

O extrato bruto metanólico das folhas de *F. chica* aumenta a produção de colágeno e fibroblastos in vitro e a aplicação tópica em ratos da espécie *Rattus norvegicus* promove rápida redução do tamanho de feridas cutâneas (Jorge et al 2008). A aplicação do extrato etanólico de *F. chica* durante a cicatrização de tendões de ratos parcialmente seccionados melhora a organização das fibras de colágeno e aumenta a quantidade de sulfato de dermatan, que é um importante agente anti-inflamatório, mostrando o potencial cicatrizante do extrato (Aro et al. 2013a, Aro et al. 2013b). Demais estudos também constataram atividade anti-inflamatória da aplicação do extrato aquoso de pariri (Michel et al. 2015), incluindo a ação do extrato pela via subcutânea e intraperitoneal contra a inflamação causada por venenos de serpentes *Crotalus durissus ruruima* e *Bothrops atrox* (Oliveira et al. 2009).

O extrato hidroetanólico das folhas de *Fridericia chica* exerce efeito protetor sobre o fígado quando administrado por via oral (Medeiros et al. 2011) e possui forte atividade antimicrobiana in vitro frente às bactérias *Helicobacter pylori* e moderada ação contra bactérias da espécie *Enterococcus faecalis* (Mafioletti et al. 2013). O extrato hidroetanólico seco de *F. chica*, administradas sob a forma de nanopartículas de quitosana-tripolifosfato de sódio contendo por via oral, protegem contra úlceras gástricas induzidas por etanol e indometacina (Servat-Medina et al. 2015).

O extrato etanólico de folhas de *F. chica* apresenta atividade antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes* e efeito tripanocida frente a *Trypanosoma cruzi* (Barbosa et al. 2008). O extrato hexânico das folhas de *F. chica* apresenta atividade leishmanicida frente à *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*, pertencentes à família Trypanosomatidae e

causadores, respectivamente, da leishmaniose cutânea e da leishmaniose visceral (Rodrigues et al. 2014). O extrato bruto etanólico das folhas de *F. chica* também apresenta atividade contra *Leishmania amazonenses* (Cortez de Sá et al. 2016) e ação antiviral frente a *Avian Metapneumovirus* (Kohn et al. 2015).

O extrato etanólico das folhas e dos frutos de *F. chica* possui ação antiviral in vitro contra HHV-1 (*Human herpesvirus*) e VACV-WR (*Vaccinia virus* Western Reserve) (Brandão et al. 2010). O extrato diclorometano das folhas possui atividade antifúngica in vitro contra as espécies do gênero *Candida* *C. rugosa*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* e *C. albicans* (Hofling et al. 2010), além de atividade inibitória da protease da *C. albicans* (Hofling et al. 2011). O extrato metanólico possui ação contra *C. albicans* (Hofling et al. 2011). O extrato de *F. chica* também possui atividade diurética (Amaral et al. 2012), o que pode explicar seu uso popular para tratar doenças do sistema urinário.

Estudos sugerem que o extrato etanólico de *F. chica* pode ser utilizado para tratamento de leucemia, por induzir apoptose de células HL-60 e Jurkat ($IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$) utilizando concentração dentro da faixa limite estabelecida pelo American National Cancer Institute para ser considerado citotóxico frente às mesmas (Michel et al. 2015). Os extratos aquosos e etanólicos das folhas de pariri foram testados contra as células de Ehrlich, os resultados sugerem que os mesmos podem retardar o crescimento dos tumores, demonstrando possível uso desses extratos como antitumorais (Ribeiro et al. 2012).

Siraichi et al. (2013b) desenvolveram uma formulação à base de folhas de *Fridericia chica* com efeito protetor contra radiação solar, incluindo radiação ultravioleta A (UVA) e ultravioleta B (UVB), sem o uso de substâncias inorgânicas. Essa formulação não apresentou efeitos tóxicos, não provocou descamação ou reação inflamatória. Outros estudos realizaram ensaios de atividade mutagênica Salmonella/Microsoma e ensaios cometas em células de ovário de hamster e não detectaram mutagenicidade e danos aparentes ao DNA causados pelo extrato bruto aquoso e pela fração butanólica das partes aéreas de *F. chica* (Gemeli et al. 2015) ou pela fração clorofórmica das partes aéreas (Santos et al. 2013). A fração clorofórmica também não causou efeitos mutagênicos em nível cromossômico, medido através de teste de micronúcleos (Santos et al. 2013). Esses estudos sugerem que a planta pode ser utilizada sem causar efeitos mutagênicos e genotóxicos aos seres vivos. Diante de todas as atividades supracitadas, percebe-se o grande potencial de *F. chica* para a produção de diversos produtos inovadores e seguros para o homem e meio ambiente.

1.3. NANODISPERSÕES

Produtos de origem vegetal possuem vasta aplicabilidade, entretanto, muitas vezes são instáveis e/ou pouco solúveis em água. Neste contexto, o desenvolvimento de nanodispersões contendo uma fase externa aquosa se configura como uma importante estratégia para sanar esses principais problemas (Chang and McClements 2014). Nanodispersões são sistemas dispersos, frequentemente estabilizados por tensoativos. Estes últimos são moléculas que possuem uma parte de sua estrutura lipofílica e outra hidrofílica, e, dependendo de seu comportamento, recebe um valor de EHL (Equilíbrio hidrófilo-lipófilo) diferente, que quanto mais baixo, mais lipofílico é o tensoativo e quanto mais alto, maior seu caráter hidrofílico (Griffin 1946).

As nanodispersões devem possuir diâmetro médio de partícula inferior a 500 nm (Solans et al. 2003, Gutierrez et al. 2008). Seu aspecto fino, translúcido ou transparente torna as nanodispersões extremamente atraentes para diferentes segmentos industriais. Permitem a incorporação de substâncias insolúveis em água em produtos aquosos com mínima alteração do aspecto visual (Saberri et al. 2013). Além disso, frequentemente aumentam a biodisponibilidade dos produtos, tornando-se também extremamente promissores para a indústria de medicamentos (Zhang et al. 2008, Wang et al. 2009, Saberri et al. 2013).

Diversos produtos biotecnológicos nanoestruturados à base de extratos, óleos ou substâncias isoladas de plantas foram desenvolvidos. Por exemplo, nanoemulsões contendo resveratrol foram obtidas com êxito empregando-se óleo de semente de uva como fase oleosa (Davidov-Pardo and McClements 2015), nanodispersões de astaxantina em leite para uso como alimentos funcionais (Anarjan and Tan 2013), nanopartículas contendo extrato de *Ocimum sanctum* com função antimicrobiana (Rajendran et al. 2013) e nanocápsulas de bixina (Lobato et al. 2015).

Entretanto, para se obter nanodispersões à base de produtos naturais pelos métodos convencionais são realizadas várias etapas e o tempo necessário pode ser muito longo, pois é preciso preparar o extrato vegetal e/ou fracioná-lo (Rajendran et al. 2013, Lobato et al. 2015) ou extrair o óleo essencial (Sousa et al. 2013) para depois realizar as dispersões. Além disso, as metodologias convencionais de preparação de nanodispersões utilizam solventes orgânicos, como hexano (Tan and Nakajima 2005, Cheong et al. 2008, Leong et al. 2011), acetona e diclorometano (Anarjan and Tan 2013), que necessitam de uma etapa posterior de remoção, aumentando os custos de produção. Estudos indicam correlação entre exposição contínua a solventes orgânicos e o aumento da incidência de infertilidade masculina (Oliva et al. 2001),

autismo (Windhan et al. 2006), câncer (Wartenberg et al. 2000) e efeitos neurotóxicos (Prieto et al. 2003), entre outros riscos à saúde humana que justificam a busca por métodos alternativos que não envolvam a utilização desses agentes nocivos.

O extrato de *F. chica* obtido através da utilização de clorofórmio foi utilizado como ativo em nanoemulsões do tipo óleo em água (Rodrigues et al., 2015), enquanto nanopartículas de quitosana-tripolifosfato de sódio contendo extrato hidroetanólico seco de *F. chica* foram preparadas através de método de alto aporte de energia, utilizando-se ultrasonicador para geração das nanoestruturas (Servat-Medina et al. 2015).

Nesse contexto, a utilização de métodos de baixo aporte energético capazes de gerar nanodispersões à base de produtos de origem vegetal, tal como folhas, com menor número de etapas e sem uso de solventes orgânicos é de extrema relevância, em termos de custos financeiros e saúde ambiental. Portanto, este trabalho tem como objetivo obter nanodispersões à base de folhas de *Fridericia chica* através de nova metodologia, utilizando-se dispersões aquosas de tensoativos como líquido extrator. Além disso, é avaliada a atividade antifúngica da nanodispersão frente a fungos do gênero *Candida*, para verificação do potencial biológico da nanodispersão aquosa obtida por esse método.

2. HIPÓTESES

- É possível preparar nanodispersões bioativas à base de folhas de *Fridericia chica* simultaneamente a extração por dispersões aquosas de tensoativos sem o uso de solventes orgânicos e sem equipamento de alto aporte energético.
- A diluição das nanodispersões melhora a resposta das variáveis dependentes.

3. OBJETIVOS

3. 1. GERAL

Obter nanodispersões à base de folhas de *Fridericia chica*.

3. 2. ESPECÍFICOS

- Determinar a proporção entre tensoativo/co-tensoativo mais adequada para obtenção das nanodispersões;
- Caracterizar as nanodispersões;
- Analisar a estabilidade física e química das nanodispersões;
- Analisar a influência da diluição em diferentes soluções;
- Avaliar a eficácia do método em obter nanodispersões bioativas através de teste de inibição de crescimento de fungos do gênero *Candida*.

4. REFERÊNCIAS

- Alves, M. S. M., P. C. Mendes, J. G. P. Vieira, E. F. Ozela, W. L. R. Barbosa, and J. O. C. Silva Junior. 2010. Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonp.) B. Verl., Bignoniaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20:215-221.
- Amaral, R. R., A. A. D. Santos, A. Saravia, G. Botas, R. A. S. Cruz, C. P. Fernandes, L. Rocha, and F. Boylan. 2012. Biological activities of *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl. Leaves. *Latin American Journal of Pharmacy* 31:451-455.
- Anarjan, N., and C. P. Tan. 2013. Chemical stability of astaxanthin nanodispersions in orange juice and skimmed milk as model food systems. *Food Chemistry* 139:527-531.
- Aro, A. A., K. M. Freitas, M. A. Flogio, J. E. Carvalho, H. Dolder, L. Gomes, B. C. Vidal, and E. R. Pimentel. 2013. Effect of the *Arrabidaea chica* extract on collagen fiber organization during healing of partially transected tendo. *Life Sciences* 92:799-807.
- Aro, A. A., G. F. Simões, M. A. M. Esquisatto, M. A. Foglio, J. E. Carvalho, and A. L. R. Oliveira. 2013. *Arrabidaea chica* extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the Achilles tendon. *Injury* 44:884-892.
- Barbosa, W. L., L. N. Pinto, E. Quignard, J. M. Vieira, J. O. Silva, and S. Albuquerque. 2008. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18:544-548.
- Biavatti, M. W., V. Marensi, S. N. Leite, and A. Reis. 2007. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17:640-653.
- Bieski, I. G. C., M. Leonti, J. T. Arnason, J. Ferrier, M. Rapinski, I. P. Violante, S. O. Balogun, J. F. C. A. Pereira, R. C. F. Figueiredo, C. R. A. S. Lopes, D. R. Silva, A. Pacini, U. P. Albuquerque, and D. T. O. Martins. 2015. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 173:383-423.
- Brandão, G. C., E. G. Kroon, J. R. Santos, J. R. Stehmann, J. A. Lombardi, and A. B. Oliveira. 2010. Antiviral activities of plants occurring in the state of Minas Gerais, Brazil. Part 2. Screenig Bignoniaceae species. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20:742-750.
- Chang, Y., and D. J. McClements. 2014. Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: influence of the oil phase, surfactante, and temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62:2306-2312.
- Chen, X. M., A. R. Tait, and D. D. Kitts. 2017. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food chemistry* 218:15-21.
- Cheong, J. N., C. P. Tan, Y. B. C. Man, and M. Misran. 2008. α -Tocopherol nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Journal of Food Engineering* 89:204-209.
- Coelho-Ferreira, M. 2009. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian Coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *Journal of Ethnopharmacology* 126:159-175.
- Coppler, L. B., J. F. Murphy, and M. D. Eubanks. 2007. Red imported fire ants (Hymenoptera: formicidae) increase the abundance of aphids in tomato. *Florida Entomologist* 90:419-425.
- Cortez de Sá, J. F. Almeida-Souza, R. Mondêgo-Oliveira, I. S. S. Oliveira, L. Lamarck, I. F. B. Magalhães, A. F. Ataídes-Lima, H. S. Ferreira, and A. L. Abreu-Silva. 2016. Leishmanicidal, cytotoxicity and wound healing potential of *Arrabidaea chica* Verlot. *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine* 16:1-11.

- Davidov-Pardo, G., and D. J. McClements. 2015. Nutraceutical delivery systems: resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Food Chemistry* 167:205-212.
- Demming-Adams, B. Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1012:1-24.
- Devia, B., G. Llabres, J. Wouters, L. Dupont, M. T. Escribano-Bailon, S. Pascual-Teresa, L. Angenot, and M. Tits. 2002. New 3-Deoxyanthocyanidins from leaves of *Arrabidaea chica*. *Phytochemical Analysis* 13:114-120.
- Dewick, P. M. 2002. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Wiley, New York, New York, USA.
- Enan, E. 2001. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology* 130:325-337.
- Evangelista, S. S., F. C. Sampaio, R. C. Parente, and M. F. C. L. Bandeira. 2013. Fitoterápicos na odontologia: estudo etnobotânico na cidade de Manaus. *Revista Brasileira de plantas medicinais* 15:513-519.
- Filella, I., J. Bosch, J. Llusà, A. Peñuelas, and J. P. Peñuelas. 2011. Chemical cues involved in the attraction of the oligolectic bee *Hoplitis adunca* to its host plant *Echium vulgare*. *Biochemical Systematic and Ecology* 39:498-508.
- Forzza, R. C., P. M. Leitman, A. F. Costa, A. A. Carvalho Jr, A. L. Peixoto, B. M. T. Walter, and G. Martinelli. 2010. Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB113356>>. Acesso em: 27 Jun. 2016.
- Gemeli, T. F., L. S. Prado, F. S. Santos, A. P. Souza, T. N. Guecheva, J. A. P. Henriques, A. B. F. Ferraz, D. S. Corrêa, R. R. Dohl, and J. N. Picada. 2015. Evaluation of Safety of *Arrabidaea chica* Verlot (bignoniaceae), a plant with healing properties. *Journal of Toxicology and Environmental health, Part A* 78:1170-1180.
- Griffin, W. C. 1946. Classification of surface-active agents by "HLB". *Journal of the society of cosmetic chemists* 1:311-326.
- Grover, J. K., S. Yadav, and V. Vats. 2002. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacology* 81:81-100.
- Gutiérrez, J. M., C. González, A. Maestro, I. Solè, C. M. Pey, and J. Nolla. 2008. Nano-emulsions: new applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 13:245-251.
- Harborne, J. B., and C. A. Williams. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55:481-504.
- Hofling, J. F., P. C. Anibal, G. A. Obando-Pereda, I. A. T. Peixoto, V. F. Furletti, M. A. Foglio, and R. B. Gonçalves. 2010. Antimicrobial potencial of some plant extract again *Candida* species. *Brazilian Journal of Biology* 70:1065-1068.
- Hofling, J. F., R. C. Mardegan, P. C. Anibal, V. F. Furletti, and M. A. Foglio. 2011. Evaluation of antifungal activity of medicinal plant extracts against oral *Candida albicans* and proteinases. *Mycopathologia* 172:117-124.
- Humboldt, A., A. Bonpland. 1808. Plantes équinoxiales: recueillies au Mexique, dans l'île de Cuba, dans les provinces de Caracas, de Cumana et de Barcelone, aux Andes de la Nouvelle-Grenade, de Quito et du Pérou, et sur les bords du rio-Negro de Orénoque et de la rivière des Amazones. Pages 1-397 in Schoell, C. F., and J. G. Gotta, editors. *Voyage de Humboldt et Bonpland*. Schoell. Paris, França.
- Jorge, M. P., C. Madjarof, A. L. T. G. Ruiz, A. T. Fernandes, R. A. F. Rodrigues, I. M. O. Sousa, M. A. Foglio, and J. E. Carvalho. 2008. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. *Journal of Ethnopharmacology* 118:361-366.

- Junker, R. R., J. Gershenzon, and S. B. Unsicker. 2011. Floral odor bouquet loses its ant repellent properties after inhibition of terpene biosynthesis. *Journal of Chemical Ecology* 37:1323-1331.
- Koes, R., W. Verweij, and F. Quattrocchio. 2005. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *TRENDS in Plant Science* 10:236-242.
- Kutchan, T. M. 2001. Ecological arsenal and developmental dispatcher: The paradigm of secondary metabolism. *American Society of Plant Biologists* 125:58-60.
- Kohn, L. K., M. A. Foglio, R. A. Rodrigues, I. M. O. Sousa, M. C. Martini, M. A. Padilla, D. F. Lima Neto, and C. W. Arns. 2015. In-vitro antiviral activities of extracts of plants of the Brazilian cerrado against the *Avian Metapneumovirus* (aMPV). *Brazilian Journal of Poultry Science* 17:275-280.
- Lentz, D. L. 1993. Medicinal and other economic plants of the Paya of Honduras. *Economic Botany* 47:358-370.
- Lentz, D. L., A. M. Clark, C. D. Hufford, B. Meurer-Grimes, C. M. Passreiter, J. Cordero, O. Ibrahimi, and A. L. Okunade. 1998. Antimicrobial properties of Honduras medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 63:253-263.
- Leong, W., O. Lai, K. Long, Y. B. C. Man, M. Misran, and C. Tan. 2011. Preparation and characterisation of water-soluble phytosterol nanodispersions. *Food Chemistry* 129:77-83.
- Lobato, K. B. S., K. Paese, J. C. Forgearini, S. S. Guterres, A. Jablonski, and A. O. Rios. 2015. Evaluation of stability of bixin in nanocapsules in model systems of photosensitization and heating. *LWT – Food Science and Technology* 60:8-14.
- Lohmann, L. G., and C. M. Taylor. 2014. A new generic classification of tribe bignoniaceae (Bignoniaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 99:348-489.
- Madaleno, I. M. 2010. Local use of front and backyard medicinal species – a comparative study in six Latin American cities. *WIT Transactions on Ecology and the Environment* 129:637-646.
- Mafioleti, L., I. F. Silva Junior, E. M. Colodel, A. Flach, and D. T. O. Martins. 2013. Evaluation of the toxicity and antimicrobial activity of hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. *Journal of Ethnopharmacology* 150:576-582.
- Magalhães, I. R. S., A. O. Soares, L. M. Araújo, P. R. C. Costa, I. A. Roland, and M. R. L. Borrás. 2009. Determination of Cu, Fe, Mn, and Zn in the leaves and tea of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bompl.) verl. *Biological Trace Element Research* 132:239-246.
- Martins, A. S., C. N. Alves, O. A. Lameira, A. S. Santos, and R. C. S. Müller. 2009. Avaliação de minerais em plantas medicinais amazônicas. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19:621-625.
- Medeiros, B. J. L., K. S. Costa, J. F. A. Ribeiro, J. O. C. Silva Junior, W. L. R. Barbosa, and J. C. T. Carvalho. 2011. Liver protective activity of a hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. and Bonpl.) B. Verl. (pariri). *Pharmacognosy Research* 3:79-84.
- Medic-Saric, M. 2008. Application of TLC in the isolation and analysis of flavonoids. Pages 405-423 in M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma and T. Kowalska, editors. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. CRC Press, New York, New York, USA.
- Michel, A. F. R. M., M. M. Melo, P. P. Campos, M. S. Oliveira, F. A. S. Oliveira, G. D. Cassali, V. P. Ferraz, B. B. Cota, S. P. Andrade, and E. M. Souza-Fagundes. 2015. Evaluation of anti-inflammatory, antiangiogenic and antiproliferative activities of *Arrabidaea chica* crude extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 165:29-38.
- Odone, G., C. Valadeau, J. Alban-Castillo, D. Stien, M. Sauvain, and G. Bourdy. 2013. Medical ethnobotany of the Chayahuita of the Parapapura basin (Peruvian Amazon). *Journal of Ethnopharmacology* 146:127-153.

- Oliva, A., A. Spira, and L. Multigner. 2001. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Human Reproduction* 16:1768-1776.
- Oliveira, A. E. M. F. M., et al. 2016. Development of a larvicidal nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel oil. *Plos ONE*: 11:1-16.
- Oliveira, D. P. C., M. R. L. Borráz, L. C. L. Ferreira, and J. L. López-Lozano. 2009. Atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. sobre o edema induzido por venenos de serpentes amazônicas. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19:643-649.
- Port's, P. S., R. C. Chisté, H. T. Godoy, and M. A. Prado. 2013. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. *Food Research International* 53:875-881.
- Prieto, M. J., D. Marhuenda, J. Roel, and A. Cardona. 2003. Free and total 2,5-hexanedione in biological monitoring of workers exposed to *n*-hexane in the shoe industry. *Toxicology Letters* 145:249-260.
- Rajendran, R., R. Radhai, T. M. Kotresh, and E. Csiszar. 2013. Development of antimicrobial cotton fabrics using herb loaded nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 91:613-617.
- Ribeiro, A. F. C., T. C. Telles, V. P. Ferraz, E. M. Souza-Fagundes, G. D. Cassali, A. T. Carvalho, and M. M. Melo. 2012. Effects of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22:364-373.
- Rodrigues, I. A., M. M. B. Azevedo, F. C M. Chaves, C. S. Alviano, D. S. Alviano, and A. B. Vermelho. 2014. *Arrabidaea chica* hexanic extract induces mitochondrion damage and peptidase inhibition on *Leishmania* spp. *Biomed Research International* 14:136-142.
- Rodrigues, M. C., L. A. Muehlmann, J. P. Longo, R. C. Silva, I. B. Graebner, I. A. Degterev, C. M. Lucci, R. B. Azevedo and M. P. Garcia. 2015. Photodynamic therapy based on *Arrabidaea chica* (Crajiuru) extract nanoemulsion: in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* 6, article 286.
- Saberi, A. H., Y. Fang, and D. J. McClements. 2013. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science* 391:95-102.
- Saeed, N., M. R. Khan, and M. Shabbir. 2012. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine* 12:221-233.
- Santos, R. I. 2010. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. Pages 403-434 in C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosmann, J. C. P. Mello, L. A. Mentz, and P. R. Petrovick, editors. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Santos, V. C., T. B. Longo, A. L. H. Garcia, M. F. Richter, T. N. Guecheva, J. A. P. Henriques, A. B. F. Ferraz, and J. N. Picada. 2013. Evaluation of the mutagenicity and genotoxicity of *Arrabidaea chica* verlot (Bignoneaceae), an amazon plant with medicinal properties. *Journal of toxicology and environmental health* 76:381-390.
- See, D. M., N. Broumand, L. Sahl, and J. G. Tilles. 1997. In vitro effects of echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. *Immunopharmacology* 35:229-235.
- Seitz, C., C. Eder, B. Deiml, S. Kellner, S. Martens, and G. Forkmann. 2006. Cloning, functional identification and sequence analysis of flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase cDNAs reveals independent evolution of flavonoid 3',5'-hydroxylase in the Asteraceae Family. *Plant Molecular Biology* 61:365-381.

- Servat-Medina, L., A. González-Gómez, F. Reyes-Ortega, I. M. O. Sousa, N. C. A. Queiroz, P. M. W. Zago, M. P. Jorge, K. M. Monteiro, J. E. Carvalho, J. S. Román, and M. A. Foglio. 2015. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticle as *Arrabidaea chica* standardized extract carrier: synthesis, characterization, biocompatibility, and antiulcerogenic activity. *International Journal of Nanomedicine* 10:3897-3909.
- Silva, E. M., J. N. Souza, H. Rogez, J. F. Rees, and Y. Larondelle. 2007. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry* 101:1012-1018.
- Simões, C. M. O., E. P. Schenkel, G. Gosmann, J. C. P. Mello, L. A. Mentz, and P. R. Petrovick. 2010. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Siraichi, J. T. G., D. F. Felipe, L. Z. S. Brambilla, M. J. Gatto, V. A. Terra, A. L. Cecchini, L. E. R. Cortez, E. Rodrigues-Filho, and A. G. Cortez. 2013a. Antioxidante capacity of the leaf extract obtained from *Arrabidaea chica* cultivated in Southern Brazil. *Plos One* 8: e72733.
- Siraichi, J. T. G., F. Pedrochi, M. R. M. Natali, T. Ueda-Nakamura, B. P. Dias, A. C. Bento, M. L. Baesso, and C. V. Nakamura. 2013b. Ultraviolet (UVB and UVA) photoprotector activity and percutaneous penetration of extracts obtained from *Arrabidaea chica*. *Applied Spectroscopy* 67:1179-1184.
- Solans, C., J. Esquema, A. M. Forgiarini, N. Usón, D. Morales, P. Izquierdo, N. Azemar, and M. J. Garcia-Celma. 2003. Nano-emulsions: formation, properties and applications. *Surfactant Science Series* 109:525-554.
- Sousa, V. P., J. Crean, V. R. A. Borges, C. R. Rodrigues, L. Tajber, F. Boylan, and L. M. Cabral. 2013. Nanostructured systems containing babaçu (*Orbinya speciosa*) oil as a potential alternative therapy for benign prostatic hyperplasia. *International Journal of Nanomedicine* 8:3129-3239.
- Takemura, O. S., M. Iinuma, H. Tosa, O. G. Miguel, E. A. Moreira, and Y. Nozawa. 1995. A flavone from leaves of *Arrabidaea chica* f. *cuprea*. *Phytochemistry* 38:1299-1300.
- Tan, C. P., and M. Nakajima. 2005. β -carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chemistry* 92:661-671.
- Wang, L., J. Dong, J. Chen, J. Eastoe, and X. Li. 2009. Design and optimization of a new self-nanoemulsifying drug delivery system. *Journal of Colloid and Interface Science* 330:443-448.
- Wartenberg, D., D. Reyner, and C. S. Scott. 2000. Trichloroethylene and cancer: epidemiologic evidence. *Environmental Health Perspectives* 108:161-176.
- Windham, G. C., L. Zhang, R. Gunier, L. A. Croen, and J. K. Grether. 2006. Autism spectrum disorders in relation to distribution of hazardous air pollutants in the San Francisco bay area. *Children's Health* 114:1438-1444.
- Winkel-Shirley, B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5:218-223.
- Zhang, Y., Y. Yang, K. Tang, X. Hu, and G. Zou. 2008. Physicochemical characterization and antioxidant activity of quercetin-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science* 107:891-897.
- Zorn, B., A. J. García-Piñeres, V. Castro, R. Murillo, G. Mora, and I. Merfort. 2001. 3-desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. *Phytochemistry* 56:831-835.
- Zuanazzi, J. A. S., and J. A. Montanha. 2010. Flavonóides. Pages 577-614 in C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosmann, J. C. P. Mello, L. A. Mentz, and P. R. Petrovick, editors. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

***Fridericia chica* aqueous nanodispersion and its antifungal potential**

Artigo submetido ao periódico "BioMed Research International".

***Fridericia chica* aqueous nanodispersion and its antifungal potential**

Jéssica Alves da Silva ^{1,2}, Regina Gendzelevski Kelmann ³, Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira ², Rodrigo Soares Alves Cruz ², José Carlos Tavares Carvalho ⁴, and Caio Pinho Fernandes ³

¹ *Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, Universidade Federal do Amapá, Brazil.*

² *Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica, Universidade Federal do Amapá, Brazil*

³ *Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Campus Governador Valadares, Universidade Federal de Juiz de Fora, Brazil.*

⁴ *Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá, Brazil.*

Correspondence should be addressed to Dr. Caio Pinho Fernandes, Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica, Universidade Federal do Amapá, Campus Marco Zero do Equador, Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira, KM 02, Bairro Zerão, CEP: 68902–280, Macapá, AP, Brazil. Tel: +55-96-98107827. E-mail: caiofernandes@unifap.br

Abstract

Herbal extracts have been considered valuable for complementary and alternative medicines. They are often prepared with organic solvents and may be used themselves as medicines or to phytopharmaceutical technology process. Aqueous products such as infusions are frequently prepared extemporaneously and have short term stability. Nanodispersions emerged as a novel system with a wide range of advantages, including potential enhancement of physical and chemical stability and water availability of bioactive compounds. However, few efforts have been observed for direct extraction of plant material with aqueous surfactant solution and consequently generation of nanostructures. The aim of the present study was to prepare an aqueous nanodispersion using *Fridericia chica*, a Brazilian folk species with several biological activities and evaluate its antifungal potential against *Candida glabrata*, *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. The influence of surfactant pair on extraction and nanodispersion formation was accessed by means of droplet size, polydispersity index, zeta potential analysis and UV-Vis spectrophotometry. Evaluation of dilutions of the nanodispersion on water or aqueous surfactant solutions was performed in order to evaluate the influence on physical stability. Better extraction conditions were observed using sorbitan monooleate/polysorbate 20 aqueous solution at hydrophile-lipophile balance (HLB = 8). The dilution of the nanodispersions in water (1:5, v/v) increased physical stability. Promising antifungal activity was observed against *Candida albicans* and *Candida glabrata*. The present study shows for the first time a low cost, fast and simple method for preparation of *F. chica* aqueous nanodispersion with promising antifungal activity. Moreover, no organic solvents were used, being in accordance with a current “green” concept for natural medicines.

Keywords: Encapsulation, organic solvent-free method, particle size, nanobiotechnology, *Candida sp.*

Introduction

Fridericia chica (Humb. & Bonpl.) B. Verlt. belongs to the Bignoniaceae botanical family, which presents 21 genus and 393 species [1]. Nowadays, this species can be found in many countries, such as Argentina, Belize, Bolivia, Brazil, Caribbean, Colombia, Ecuador, El Salvador, French Guiana, Guatemala, Honduras, Mexico, Nicaragua, Panama, and Venezuela [2].

Several phytochemical studies were carried out with *F. chica*, indicating the presence of anthocyanins [3, 4, 5], anthocyanidins [6, 7, 3, 4, 8], anthraquinones [3, 4], alkaloids [4, 9], catechins [3, 4], chalcones [8], organic acids [3], reducing sugars [3, 4], steroids [3, 4, 10], quinones [11], xanthenes [3], flavanonols [3, 4], flavanones [3, 4, 5], flavones [5, 12], tannins [3, 4, 8], saponins [4, 9], and triterpenes [10]. *F. chica* dried leaves have a typical red color, mainly due to the presence of four 3-desoxyanthocyanidins: carajurin, carajurone, 6,7,3',4'-tetrahydroxy-5-methoxy-flavylium, and 6,7,3'-trihydroxy-5,4'-dimethoxy-flavilium [6, 7].

Leaves and stems of *F. chica* are widely used in Amazon folk medicine for various uses, including treatment of anemia [13], chicken pox [14], wounds [15, 16, 14], eye infections [17, 18], inflammation [19], infection in the ovaries, bladder and kidneys, cancer, menstrual cramps, renal colic, blood depurative, fever, indisposition, inflammation of the uterus, rheumatism [20, 2], ulcer [15], and measles [14].

Due to the great ethnopharmacological potential, several biological evaluation studies were performed with *F. chica*, showing that this plant have antioxidant [13] and wound healing activities [16, 21, 22], hepatoprotective effect [11], anti-inflammatory [23, 24], antiulcerogenic [25], antibacterial [5], antileishmanial [26, 8] and antiviral [10, 27] activities, diuretic action [28], antitumor activity [29, 24], photoprotection effect [30] and antifungal action [3, 31, 32].

Natural products from plant origin have several applications, however, in some cases they are instable or have poor solubility in water. In this context, the development of nanodispersions containing an aqueous external phase can be an important strategy to solve these major problems [33]. Aqueous nanodispersions are dispersed systems, often stabilized by surfactants and have average particle diameter should be less than 500 nm [34, 35]. Due to small particle size, they have kinetic stability and may present a translucent or transparent appearance. Moreover, they may increase the bioavailability of the bioactive product, enhance chemical stability and even controlled release of compounds, making them extremely promising for the pharmaceutical industry [37, 36].

Prior to preparation of natural products-based nanodispersions, it is necessary to obtain the plant extract or fractions [38, 39, 40, 41]. Moreover, conventional methods for nanodispersion preparation often involves organic solvents such as hexane [42, 43, 44, 45], acetone and dichloromethane [46] and a further step for removal of the volatile solvent. Studies have indicated that continuous exposure to organic solvents can increase the incidence of cancer [47], infertility [48], autism [49], neurotoxic effects [50] and other risks to human health. Therefore, development and utilization of alternative novel methods capable of make aqueous nanodispersions based on natural products with fewer steps and without the use of organic solvents is extremely important in terms of costs and environmental health. This study aims to prepare aqueous nanodispersions based on *Fridericia chica* leaves through a new methodology using aqueous solution of surfactants as extractor liquid. Moreover, we evaluated the efficacy of the method to obtain a bioactive nanodispersion using an antifungal assay against *Candida* species as a model, since *F. chica* has know activity against these microorganism.

Materials and Methods

Plant material

Fridericia chica aerial parts were collected in the Macapá city, Brazil. The plant material was identified by comparison with a voucher specimen deposited at the Oriental Amazon Herbarium – IAN (PA, Brazil) under the register number 194107. The leaves were dried at room temperature (25 °C) and protected from light. Dry leaves were ground using a knife mill and stored protected from light until utilization.

Preparation of F. chica Aqueous Nanodispersions

The aqueous solutions that were used for the extraction were prepared by dispersing the surfactants sorbitan monooleate/polysorbate 20 at different blends in distilled water (1%, w/w) under mechanical stirring (500 rpm) for 10 minutes. The *F. chica* leaves were extracted with the aqueous surfactant solutions (1:20, w/w) for 5 hours under mechanical stirring of 500 rpm. After this period, the *F. chica* aqueous nanodispersions were filtered, centrifuged and stored protected from light.

The resulting hydrophile-lipophile balance (HLB), ranging from 8 to 16.7, of each surfactant blend that was used on the extractor aqueous solution was calculated as follows:

$$HLB_m = \frac{HLB_A \times m_A + HLB_B \times m_B}{m_A + m_B},$$

Where HBL_m , is the HLB of surfactants mixture, HLB_A is the HLB of most hydrophobic surfactant (sorbitan monooleate; $HLB = 4.3$), HLB_B is the HLB of most hydrophilic surfactant (polysorbate 20; $HLB = 16.7$), m_A is the mass of most hydrophobic surfactant and m_B is the mass of most hydrophilic surfactant.

*Influence of Dilution on Behavior of *F. chica* Aqueous Nanodispersions*

The effect of dilution on behavior of *F. chica* aqueous nanodispersions was performed in order to evaluate the influence on parameters associated to physical stability of colloidal systems.

The aqueous nanodispersions were diluted (1:5, v/v) in water or aqueous solution (1% w/w) of non-ionic co-surfactants [51], which were prepared using polyethyleneglycol monooleate 400, or polyethyleneglycol dioleate 400 or blends of polysorbate 20/sorbitan monooleate (HLB value of 8 to 16.7).

Characterization of Aqueous Nanodispersions

Macroscopic aspects were observed, including phase separation, sedimentation, color, and formation of precipitate. The aqueous nanodispersions were characterized by particle size, polydispersity index and zeta potential, using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) equipped with a 10 mW “red” laser ($\lambda = 632.8$ nm) and samples were measured at a 90° scattering detector angle for size measurements. All the aqueous nanodispersions were diluted with deionized water (1:25, v/v) prior to measurements. The data were measured in triplicate and results are expressed as mean \pm standard deviation.

The particle size growth of the aqueous nanodispersions was measured as follows [52]:

$$\text{Particle growth (PG)}_{0,t} = \frac{d(t) \times 100}{d(0)}$$

Where particle growth (PG)_{0,t} reflects the increase in droplet size, d(t) is average diameter of the particles after “t” days, and d(0) is the initial average diameter of the particles.

The absorbance stability of the *F. chica* aqueous nanodispersions was performed using a UV-Vis spectrometer (UV-mini 1240, Shimadzu, Kyoto, Japan). The nanodispersions were

diluted in methanol (1:100, v/v) and subjected to UV-Vis scan analysis (200-900 nm) The absorption fading (λ) was calculated by:

$$\lambda = \left(\frac{A_7 \times 100}{A_0} \right) - 100$$

Where A_7 is the absorption in day 7, and A_0 is the absorption in day 0.

Antifungal assay

Strains of *Candida glabrata* INCQS 40136 (ATCC 2001), *Candida albicans* INCQS 40071 (ATCC 18804), and *Candida tropicalis* INCQS 40042 (ATCC 13803) were used for antifungal assay. The strains were cultured in Sabouraud dextrose agar (Becton Dickinson) at 26 °C. Then, a disk of 0.5 cm of the growth media containing each *Candida* was collected and individually kept on a glass tube containing 5 mL of yeast extract (Kasvi). After 48 h, the suspensions were used for antifungal assay.

Aliquot of 500 μ L of optimized *F. chica* aqueous nanodispersion, 500 μ L of inoculum and 4 mL de distilled water were added in test tubes. Then, transmittance was measured at 600 nm [53] using a UV-Vis spectrometer (UV-mini 1240, Shimadzu, Kyoto, Japan) and the tubes were incubated at 26 °C for 48 h. After this period, transmittance was measured again. Increase turbidity was calculated as:

$$\text{Turbidity increase (\%)} = \left(\frac{T}{T_0} \times 100 \right) - 100$$

Where T_0 and T are turbidity at initial time and final turbidity, respectively. Wherein turbidity was adopted as 100 – Transmittance [54]. Blank was performed using deionized water instead of nanodispersion.

Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey-test or Bonferroni correction for compare the means of preselected pairs. Analysis were performed using GraphPad Prism software. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results and Discussion

F. chica nanodispersions presented a red color and homogeneous opaque appearance after preparation, while a translucent orange aspect was observed after dilution. As shown in Figure 1, all the formulations presented mean droplet size below 200 nm at the moment of preparation, day 0. This size is in accordance with literature criteria for nanodispersions [34, 35]. The lowest polydispersity index (0.1673 ± 0.02325) was observed for nanodispersion prepared with aqueous solution of surfactants at HLB value of 8. This value was considered significant different when compared to nanodispersion prepared with aqueous surfactant at HLB value of 9 ($p = 0.0008$) and remaining formulations ($p < 0.0001$). Polydispersity index lower than 0.3 indicate droplet size distribution within a narrow range, suggesting homogeneity of particle size distribution [55]. On another hand, polydispersity index higher than 0.5 broad size distribution, which may also be associated to instability of the system [55].

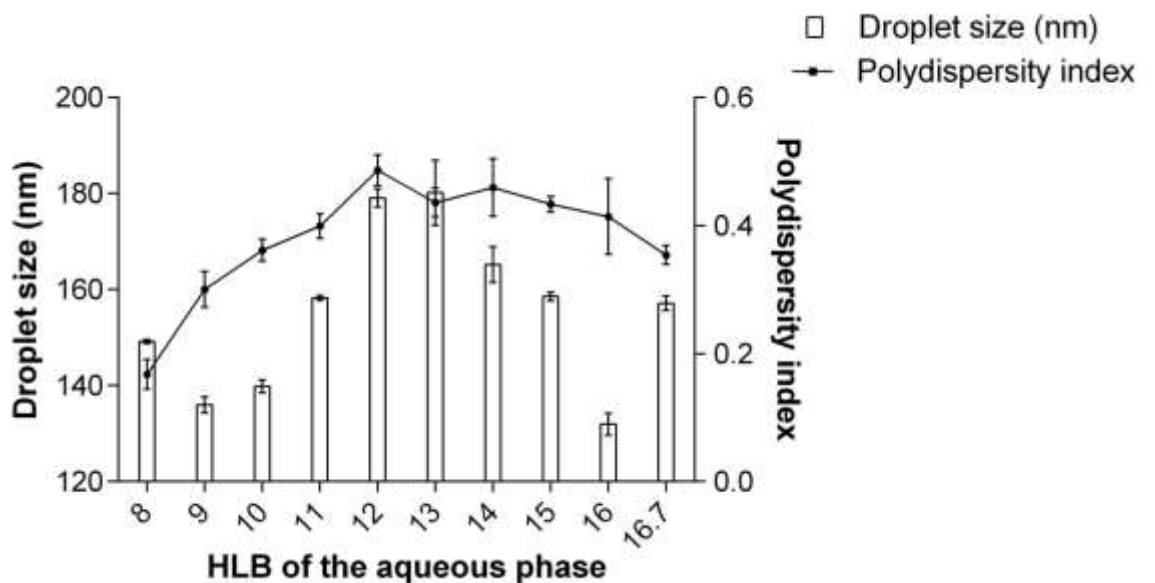


FIGURE 1: Droplet size, and polydispersity index of the nanodispersions at day 0.

Zeta potential and particle growth are shown in the Table 1. No significant difference on zeta potential was observed for nanodispersions prepared with aqueous surfactant at HLB values of 9, 10, 11, 13 and 16. The zeta potential is a critical parameter that is associated to the surface of the charge, being considered a valuable parameter for assessment of the stability of nanodispersions [55, 56]. The partition of natural compounds that may dissociate and generate anions, with a consequent presence of this ions on the interface between the internal and external phase, may be responsible by negative zeta potential values [57]. Low particle growth was observed for nanodispersions prepared with aqueous surfactant at HLB values of 8 and 15. Variation of droplet size is in function of time, measure as percentage of droplet size in relation to preparation day, and should be closest to 100 % for small variation. Values lower than 100 % represent reduce particle size and higher values express increase of droplet size.

TABLE 1: Particle growth (PG) in droplet size without dilution, and zeta potential.

HLB	PG 0, 1 (%)	PG 0, 7 (%)	Zeta potential (mV) Day 0	Zeta potential (mV) Day 7
8	242.76	613.14	-29.8 ± 0.306 a	-25.4 ± 0.451 b
9	273.01	981.62	-26.1 ± 4.310 a	-27.0 ± 0.700 a
10	337.48	1962.09	-27.8 ± 1.900 a	-30.1 ± 0.404 a
11	296.97	1276.23	-27.6 ± 0.907 a	-26.4 ± 0.321 a
12	187.27	1059.18	-31.7 ± 0.721 a	-24.6 ± 0.723 b
13	150.08	799.56	-28.3 ± 1.520 a	-26.8 ± 0.862 a
14	138.80	917.07	-33.4 ± 1.380 a	-24.3 ± 1.13 b
15	139.37	641.01	-27.6 ± 1.100 a	-23.6 ± 0.115 b
16	165.81	767.25	-24.9 ± 3.800 a	-18.8 ± 0.252 a
16.7	178.29	1972.63	-17.2 ± 0.436 a	-22.9 ± 0.693 b

PG 0,1 (%) is the particle size growth from day 1 to day 0 (percentage), PG 0,7 (%) is the particle size growth from day 7 to day 0 (percentage) (percentage). HLB is the hydrophile-lipophile balance of surfactant blend in the aqueous phase used as extractor liquid. Values in the same line with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

The UV-Vis scan analysis at day 0 showed that all samples presented maximum peaks at 307 nm (absorbance between 0.312 for HLB value of 9 and 0.621 for HLB values of 12 and at 665 ± 2 nm (absorbance between 0.024 for HLB value of 9 and 0.057 for HLB value of 12. The formulation that showed lower absorption fading (λ_{307}) after 7 days of storage was the nanodispersion prepared with aqueous solution of surfactants with HLB value of 8 (absorption loss of approximately 3.7%), suggesting that this nanodispersion has the better chemical stability. Higher change absorbance (λ_{665}) was observed, respectively, for nanodispersions prepared with aqueous solution of surfactants at HLB values of 14, 16.7, 15 and 8.

All the formulations showed values of droplet size, polydispersity index and zeta potential within the range obtained by other authors, who use conventional methods [25, 39, 42, 43, 44]. Included nanodispersions prepared by method of high-pressure homogenization, as water-soluble phytosterol nanodispersions, with size between 50 – 290 nm, and polydispersity index within the range of 0.120 – 0.570 [43]. Considering the best results in the analyzed parameters, the nanodispersion prepared with aqueous solution of surfactants at HLB value of 8 was considered the optimized nanodispersion and chosen for additional studies regarding effect of dilution on *F. chica* aqueous nanodispersions and evaluation of antifungal activity.

Droplet size and polydispersity index of the diluted nanodispersions are shown in the Figure 2. Particle growth after seven days of storage and zeta potential values are shown in Table 2. In general, dilution of the nanodispersion reduced the particle growth and the polydispersity index, and enhanced stability, when compared to undiluted nanodispersions.

Similar results were obtained by Saberi et al. diluting vitamin E-enriched mini-emulsions [51], and by Guttoff et al. diluting vitamin D nanoemulsion-based in water [52]. Reduction on particle size and higher zeta potential after 7 days of storage may suggest that dilution with aqueous surfactant blend at the same HLB value of the former extractor liquid may be the best choice. However, further investigation about the phenomena involved and even chemical stability of the chemical marker should be performed.

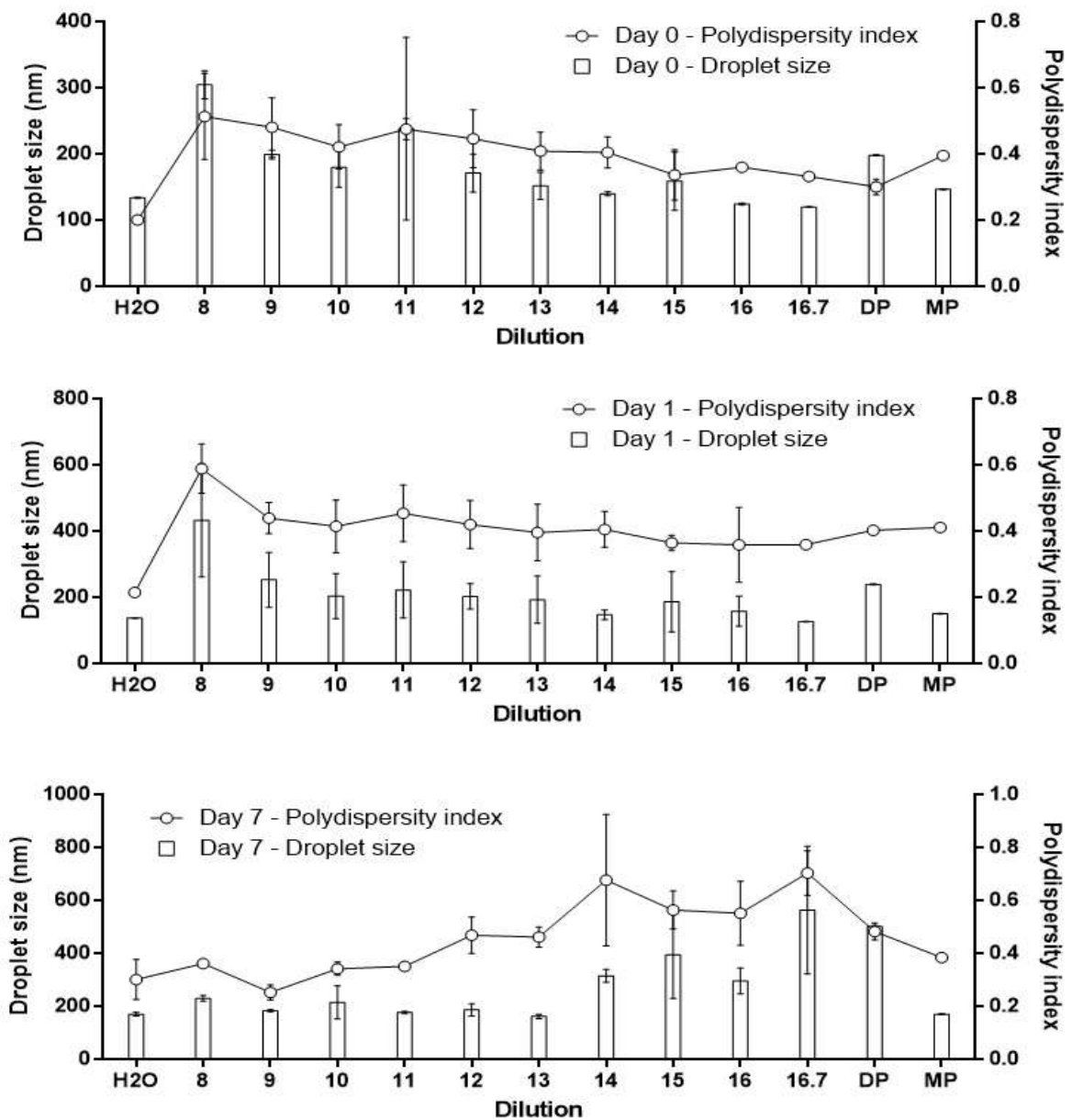


FIGURE 2: Droplet size, and polydispersity index of the diluted nanodispersions. Dilution refers to solution which nanodispersions were diluted. H₂O is distilled water, numbers 8 to 16.7 represent surfactant mixture polysorbate 20 and sorbitan monooleate with HLB ranging from 8 to 16.7. DP is polyethylene glycol 400 dioleate, and MP is polyethylene glycol 400 monooleate.

TABLE 2: Particle growth and zeta potential of diluted nanodispersions.

Dilution	PG 0, 1 (%)	PG 0, 7 (%)	Zeta Potential at Day 0 (mV)	Zeta Potential at Day 7 (mV)
Water	103.30	127.81	-29.13 ± 1.55 a	-22.0 ± 1.9 b
8	142.16	75.90	-30.6 ± 0.75 a	-33.57 ± 0.25 bc
9	127.34	92.79	-29.7 ± 0.53 a	-30.27 ± 0.55 ab
10	113.77	120.17	-28.83 ± 0.50 a	-32.97 ± 2.20 b
11	93.60	74.75	-27.1 ± 0.70 a	-32.27 ± 2.60 b
12	118.91	109.61	-26.07 ± 0.32 a	-31.6 ± 1.77 b
13	127.47	107.29	-24.67 ± 0.35 a	-30.67 ± 2.37 b
14	105.97	225.67	-22.27 ± 0.49 a	-31.4 ± 1.93 c
15	117.67	248.00	-21.43 ± 1.15 a	-25.1 ± 0.72 b
16	127.75	238.47	-20.3 ± 0.46 a	-23.37 ± 1.46 b
16.7	106.47	469.07	-19.57 ± 0.61 a	-20.2 ± 0.46 a
DP 400	120.90	253.19	-30.93 ± 1.12 a	-35.43 ± 1.16 b
MP 400	103.30	116.90	-20.83 ± 1.12 a	-24.7 ± 0.78 b

0, 1 (%) is the droplet size at day 1 in relation to day 0 (percentage), Droplet size 0, 7 (%) is the droplet size at day 7 in relation to day 0 (percentage). Dilution refers to solution which nanodispersions were diluted, numbers 8 to 16.7 represent surfactant mixture polysorbate 20 and sorbitan monooleate with HLB ranging from 8 to 16.7. DP is polyethylene glycol 400 dioleate, and MP is polyethylene glycol 400 monooleate. Values in the same line with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Antifungal Test

Antifungal test results against *C. glabrata*, *C. albicans*, and *C. tropicalis* are shown in the Figure 3. Each column represents turbidity increase after 48 hours of incubation. Statistical significant difference between tested and blank groups were observed for *C. glabrata* ($p = 0.0039$) and *C. albicans* ($p < 0.0001$) (Figure 3). The decrease on turbidity of groups treated with nanodispersion suggested enhanced antifungal effect when compared to blank. No indicative of antifungal effect of the nanodispersion against *C. tropicalis* was observed due to absence of any significant difference to blank group ($p = 0.1209$). A previous study carried out with *Candida* sp. clinical strains revealed that the leaf extract of *F. chica* presented activity against *C. albicans* and *C. tropicalis*, while *C. glabrata* was considered resistant [31]. However, on another study carried out with the same against *C. albicans* strain, obtained from the oral cavity of adults and 24-36 months aged children, it was observed a low antifungal activity of leaves extract of *F. chica* [32].

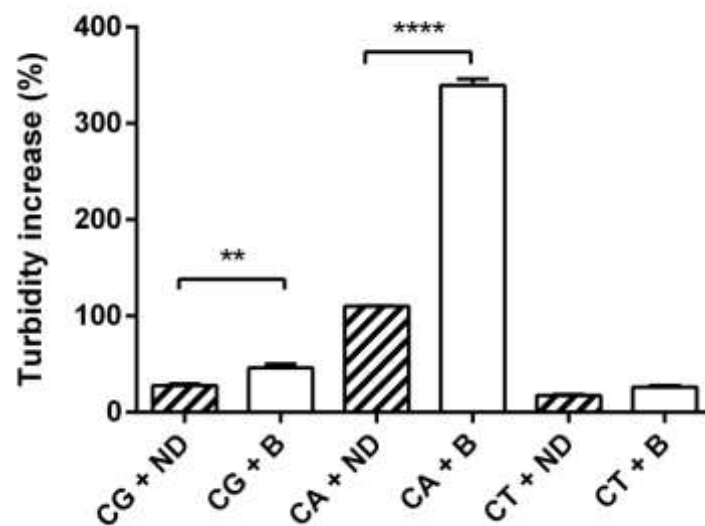


FIGURE 3: Turbidity increase (%). Statistical comparison was made with the control; ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. CG: *Candida glabrata*, CA: *Candida albicans*, CT: *Candida tropicalis*, ND: *F. chica* nanodispersion, B: blank (water).

Conclusion

The proposed method demonstrate the feasibility of obtaining *F. chica*-based aqueous nanodispersions after extraction of the plant material with aqueous surfactant mixtures. This work can contribute for the advance in development of natural products without using organic solvents, in accordance with an ecofriendly approach. The antifungal activity of the nanodispersions produced by this new method suggests the maintenance of bioactive compounds by this technique, corroborating their potential as nanophytomedicines.

Acknowledgments

The authors are grateful for the collaboration of the botanist Rosângela Sarquis in the plant identification. The authors are thankful to CAPES (Brazil) and UNIFAP (Brazil) for the financial support to this study.

Declaration of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

References

- [1] L. G. Lohmann, and C. M. Taylor, “A new generic classification of tribe bignonieae (Bignoniaceae)”, *Annals of the Missouri Botanical Garden*, vol. 99, no. 3, pp. 348-489, 2014.
- [2] I. G. C. Bieski, M. Leonti, J. T. Arnason et al, “Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil”, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 173, pp. 383-423, 2015.

- [3] W. L. Barbosa, L. N. Pinto, E. Quignard, J. M. Vieira, J. O. Silva, and S. Albuquerque, “*Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities”, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 18, no. 4, pp. 544-548, 2008.
- [4] M. S. M. Alves, P. C. Mendes, J. G. P. Vieira, E. F. Ozela, W. L. R. Barbosa, and J. O. C. Silva Junior, “Pharmacognostic analysis of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt. leaves, Bignoniaceae”, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 20, no. 2, pp. 215-221, 2010.
- [5] L. Mafioleti, I. F. Silva Junior, E. M. Colodel, A. Flach, and D. T. O. Martins, “Evaluation of the toxicity and antimicrobial activity of hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl”, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 150, pp. 576-582, 2013.
- [6] B. Zorn, A. J. García-Piñeres, V. Castro, R. Murillo, G. Mora, and I. Merfort, “3-desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*”, *Phytochemistry*, vol. 56, pp. 831-835, 2001.
- [7] B. Devia, G. Llabres, J. Wouters et al., “New 3-Deoxyanthocyanidins from leaves of *Arrabidaea chica*”, *Phytochemical Analysis*, vol. 13, pp. 114-120, 2002.
- [8] J. Cortez de Sá, F. Almeida-Souza, R. Mondêgo-Oliveira et al., “Leishmanicidal, cytotoxicity and wound healing potential of *Arrabidaea chica* Verlot”, *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*, vol. 16, no. 1, pp. 1-11, 2016.
- [9] V. C. Santos, T. B. Longo, A. L. H. Garcia et al., “Evaluation of the mutagenicity and genotoxicity of *Arrabidaea chica* verlot (Bignoneaceae), an amazon plant with medicinal properties”, *Journal of toxicology and environmental health*, vol. 76, pp. 381-390, 2013.
- [10] G. C. Brandão, E. G. Kroon, J. R. Santos, J. R. Stehmann, J. A. Lombardi, and A. B. Oliveira, “Antiviral activities of plants occurring in the state of Minas Gerais, Brazil.

- Part 2. Screenig Bignoniaceae species”, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 20, no. 5, pp. 742-750, 2010.
- [11] B. J. L. Medeiros, K. S. Costa, J. F. A. Ribeiro, J. O. C. Silva Junior JOC, W. L. R. Barbosa, and J. C. T. Carvalho, “Liver protective activity of a hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. and Bonpl.) B. Verl. (pariri)”, *Pharmacognosy Research*, vol. 3, no. 2, pp. 79-84, 2011.
- [12] J. T. G. Siraichi, D. F. Felipe, L. Z. S. Brambilla et al., “Antioxidante capacity of the leaf extract obtained from *Arrabidaea chica* cultivated in Southern Brazil”, *PLoS ONE*, vol. 8, Article ID e72733, 2013.
- [13] E. M. Silva, J. N. Souza, H. Rogez, J. F. Rees, and Y. Larondelle, “Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region”, *Food Chemistry*, vol. 101, pp. 1012-1018, 2007.
- [14] G. Odone, C. Valadeau, J. Alban-Castillo, D. Stien, M. Sauvain, and G. Bourdy, “Medical ethnobotany of the Chayahuita of the Parapapura basin (Peruvian Amazon)”, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 146, pp. 127-153, 2013.
- [15] M. W. Biavatti, V. Marensi, S. N. Leite, and A. Reis, “Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest”, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 17, no. 4, pp. 640-653, 2007.
- [16] M. P. Jorge, C. Madjarof, A. L. T. G. Ruiz et al., “Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract”, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 118, pp. 361-366, 2008.
- [17] D. L. Lentz, “Medicinal and other economic plants of the Paya of Honduras”, *Economic Botany*, vol. 47, no. 4, pp. 358-370, 1993.
- [18] D. L. Lentz, A. M. Clark, C. D. Hufford et al., “Antimicrobial properties of Honduras medicinal plants”, *Journal of Ethnopharmacology*, 63:253-263, 1998.

- [19] S. S. Evangelista, F. C. Sampaio, R. C. Parente, and M. F. C. L. Bandeira, “Fitoterápicos na odontologia: estudo etnobotânico na cidade de Manaus”, *Revista Brasileira de plantas medicinais*, vol. 15, no. 4, pp. 513-519, 2013.
- [20] M. Coelho-Ferreira, “Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian Coastal community of Marudá, Pará State (Brazil)”, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 126, pp. 159-175, 2009.
- [21] A. A. Aro, K. M. Freitas, M. A. Flogio et al., “Effect of the *Arrabidaea chica* extract on collagen fiber organization during healing of partially transected tendon”, *Life Sciences*, vol. 92, pp. 799-807, 2013.
- [22] A. A. Aro, G. F. Simões, M. A. M. Esquisatto, M. A. Foglio, J. E. Carvalho, and A. L. R. Oliveira, “*Arrabidaea chica* extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the Achilles tendon”, *Injury*, vol. 44, pp. 884-892, 2013.
- [23] D. P. C. Oliveira, M. R. L. Borráz, L. C. L. Ferreira, and J. L. López-Lozano, “Anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. on the self-induced inflammatory process from venoms amazonians snakes”, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 19, no. 2, pp. 643-649, 2009.
- [24] A. F. R. M. Michel, M. M. Melo, P. P. Campos et al., “Evaluation of anti-inflammatory, antiangiogenic and antiproliferative activities of *Arrabidaea chica* crude extracts”, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 165, pp. 29-38, 2015.
- [25] L. Servat-Medina, A. González-Gómez, F. Reyes-Ortega et al., “Chitosan-tripolyphosphate nanoparticle as *Arrabidaea chica* standardized extract carrier: synthesis, characterization, biocompatibility, and antiulcerogenic activity”, *International Journal of Nanomedicine*, vol. 10, pp. 3897-3909, 2015.
- [26] I. A. Rodrigues, M. M. B. Azevedo, F. C. M. Chaves, C. S. Alviano, D. S. Alviano, and A. B. Vermelho, “*Arrabidaea chica* hexanic extract induces mitochondrion damage and

- peptidase inhibition on *Leishmania* spp”, *Biomed Research International*, vol. 14, pp. 136-142, 2014.
- [27] L. K. Kohn, M. A. Foglio, R. A. Rodrigues et al., “In-vitro antiviral activities of extracts of plants of the Brazilian cerrado against the *Avian Metapneumovirus* (aMPV)”, *Brazilian Journal of Poultry Science*, vol. 17, no. 3, pp. 275-280, 2015.
- [28] R. R. Amaral, A. A. D. Santos, A. Saravia et al., “Biological activities of *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl. Leaves”, *Latin American Journal of Pharmacy*, vol. 31, no. 3, pp. 451-455, 2012.
- [29] A. F. C. Ribeiro, T. C. Telles, V. P. Ferraz et al., “Effects of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development”, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 22, no. 2, pp. 364-373, 2012.
- [30] J. T. G. Siraichi, F. Pedrochi, M. R. M. Natali et al., “Ultraviolet (UVB and UVA) photoprotector activity and percutaneous penetration of extracts obtained from *Arrabidaea chica*”, *Applied Spectroscopy*, vol. 67, no. 10, pp. 1179-1184, 2013.
- [31] J. F. Hofling, P. C. Anibal, G. A. Obando-Pereda et al., “Antimicrobial potential of some plant extract against *Candida* species”, *Brazilian Journal of Biology*, vol. 70, no. 4, pp. 1065-1068, 2010.
- [32] J. F. Hofling, R. C. Mardegan, P. C. Anibal, V. F. Furletti, and M. A. Foglio, “Evaluation of antifungal activity of medicinal plant extracts against oral *Candida albicans* and proteinases”, *Mycopathologia*, vol. 172, pp. 117-124, 2011.
- [33] Y. Chang, and D. J. McClements, “Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: influence of the oil phase, surfactant, and temperature”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, pp. 2306-2312, 2014.

- [34] C. Solans, J. Esquema, A. M. Forgiarini et al., “Nano-emulsions: formation, properties and applications”, *Surfactant Science Series*, vol. 109, pp. 525-554, 2003.
- [35] J. M. Gutierrez, C. González, A. Maestro, I. Solè, C. M. Pey, and J. Nolla, “Nano-emulsions: new applications and optimization of their preparation”, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 13, pp. 245-251, 2008.
- [36] A. H. Saberi, Y. Fang, and D. J. McClements, “Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification”, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 391, pp. 95-102, 2013.
- [37] L. Wang, J. Dong, J. Chen, J. Eastoe, and X. Li, “Design and optimization of a new self-nanoemulsifying drug delivery system”, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 330, pp. 443-448, 2009.
- [38] R. Rajendran, R. Radhai, T. M. Kotresh, and E. Csiszar, “Development of antimicrobial cotton fabrics using herb loaded nanoparticles”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 91, pp. 613-617, 2013.
- [39] K. B. S. Lobato, K. Paese, J. C. Forgearini, S. S. Guterres, A. Jablonski, and A. O. Rios, “Evaluation of stability of bixin in nanocapsules in model systems of photosensitization and heating”, *LWT – Food Science and Technology*, vol. 60, pp. 8-14, 2015.
- [40] A. Manosroi, W. Ruksiriwanich, M. Abe, H. Sakai, W. Manosroi, and J. Manosroi, “Biological activities of the rice bran extract and physical characteristics of its entrapment in niosomes by supercritical carbon dioxide fluid”, *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 54, pp. 137-144, 2010.
- [41] V. P. Sousa, J. Crean, V. R. A. Borges et al., “Nanostructured systems containing babaçu (*Orbinya speciosa*) oil as a potential alternative therapy for benign prostatic hyperplasia”, *International Journal of Nanomedicine*, vol. 8, pp. 3129-3239, 2013.

- [42] C. P. Tan, and M. Nakajima, “ β -carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation”, *Food Chemistry*, vol. 92, pp. 661-671, 2005.
- [43] W. Leong, O. Lai, K. Long, Y. B. C. Man, M. Misran, and C. Tan, “Preparation and characterisation of water-soluble phytosterol nanodispersions”, *Food Chemistry*, vol. 129, pp. 77-83, 2011.
- [44] J. N. Cheong, C. P. Tan, Y. B. C. Man, and M. Misran, “ α -tocopherol nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation”, *Journal of Food Engineering*, vol. 89, pp. 204-209, 2008.
- [45] H. D. Silva, M. A. Cerqueira, B. W. S. Souza et al., “Nanoemulsions of β -carotene using a high-energy emulsification-evaporation technique”, *Journal of Food Engineering*, vol. 102, pp. 130-135, 2011.
- [46] N. Anarjan, and C. P. Tan, “Chemical stability of astaxanthin nanodispersions in orange juice and skimmed milk as model food systems”, *Food Chemistry*, vol. 139, pp. 527-531, 2013.
- [47] D. Wartenberg, D. Reyner, and C. S. Scott, “Trichloroethylene and cancer: epidemiologic evidence”, *Environmental Health Perspectives*, vol. 108, pp. 161-176, 2000.
- [48] A. Oliva, A. Spira, and L. Multigner, “Contribution of environmental factors to the risk of male infertility”, *Human Reproduction*, vol. 16, no. 8, pp. 1768-1776, 2001.
- [49] G. C. Windham, L. Zhang, R. Gunier, L. A. Croen, and J. K. Grether, “Autism spectrum disorders in relation to distribution of hazardous air pollutants in the San Francisco bay area”, *Children’s Health*, vol. 114, no. 9, pp. 1438-1444, 2006.
- [50] M. J. Prieto, D. Marhuenda, J. Roel, and A. Cardona, “Free and total 2,5-hexanedione in biological monitoring of workers exposed to n-hexane in the shoe industry”, *Toxicology Letters*, vol. 145, pp. 249-260, 2003.

- [51] A. H. Saberi, Y. Fang, and D. J. McClements, "Stabilization of vitamin E-enriched mini-emulsions: Influence of organic and aqueous phase compositions", *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 449, pp. 65-73, 2014.
- [52] M. Guttoff, A. H. Saberi, and D. J. McClements, "Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: Factors affecting particle size and stability", *Food Chemistry*, vol. 171, pp. 117-122, 2015.
- [53] Y. J. Jo, J. Y. Chun, Y. J. Kwon, S. G. Min, G. P. Hong, and M. J. Choi. "Physical and antimicrobial properties of trans-cinnamaldehyde nanoemulsions in water melon juice", *LWT - Food Science and Technology*, vol. 60, pp. 444-451, 2015.
- [54] L. O . Orafidiya, and F. A. Oladimeji, "Determination of the required HLB values of some essential oils", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 237, pp. 241-249, 2002.
- [55] B. Cui, L. Feng, Z. Pan et al., "Evaluation of stability and biological activity of solid nanodispersion of lambda-cyhalothrin", *PLoS ONE*, vol. 10, Article ID e0135953, 2015.
- [56] R. Singh, and J. W. Lillard Junior, "Nanoparticle-based targeted drug delivery", *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 86, pp. 215-223, 2009.
- [57] D. O. Dias, M. Colombo, R. G. Kelmann et al., "Optimization of Copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods", *Industrial Crops and Products*, vol. 59, pp. 154-162, 2014.

6. CONCLUSÕES

- O método desenvolvido, sem uso de solvente orgânico e com baixo aporte energético, foi capaz de preparar nanodispersões da espécie estudada.
- A proporção de tensoativos mais adequada para a obtenção das nanodispersões foi a com equilíbrio hidrófilo-lipófilo de valor 8, embora todas tenham sido satisfatórias.
- A diluição das nanodispersões melhorou a estabilidade e reduziu o incremento de tamanho de partícula, em relação aos valores dos mesmos sem diluição, sendo a diluição em água destilada a melhor dentre as testadas.
- A nanodispersão otimizada reduziu o crescimento de *Candida albicans* e *Candida glabrata*, em relação ao grupo controle, sugerindo potencial uso como antifúngico.
- O preparo de nanodispersões simultaneamente ao processo extrativo da droga vegetal, se mostra uma técnica simples, fácil, rápida e de baixo custo monetário, em relação às metodologias mais difundidas e utilizadas na literatura. Estudos de escalonamento devem ser realizados para verificação da aplicabilidade para a escala industrial.

ANEXO 1. Confirmação de submissão de artigo a BioMed Research International.



Author Activities

MS Number	Title & Authors	Additional Files	Status
 7847025.v1 (Research Article)	 Fridericia chica aqueous nanodispersion and its antifungal potential Jessica Silva, Regina Gendzelevski, Anna Oliveira, Rodrigo Alves Cruz, José Carvalho, and Calo P. Fernandes	 Cover Letter	Under Review