

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS TOLEDO**

ALANA CARLA BATTISTELLA

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Pterocaulon angustifolium*, *Praxelis sanctopaulensis* e
Disynaphia filifolia E AVALIAÇÃO DA AÇÃO CONSERVANTE EM EMULSÕES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS E
BIOTECNOLÓGICOS
PPGQB**

TOLEDO

2020

ALANA CARLA BATTISTELLA

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Pterocaulon angustifolium*, *Praxelis sanctopaulensis* e *Disynaphia filifolia* E AVALIAÇÃO DA AÇÃO CONSERVANTE EM EMULSÕES

Biological activities of *Pterocaulon angustifolium*, *Praxelis sanctopaulensis* and *Disynaphia filifolia* and evaluation of preservative action in emulsions

Trabalho de conclusão de curso de dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Shioji Tiunan

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara

TOLEDO

2020



[4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que lhe atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Esta licença costuma ser comparada com as licenças de software livre e de código aberto "copyleft". Todos os trabalhos novos baseados no seu terão a mesma licença, portanto quaisquer trabalhos derivados também permitirão o uso comercial.



ALANA CARLA BATTISTELLA

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PTEROCAULON ANGUSTIFOLIUM, PRAXELIS SANCTOPAULSENSIS E
DISYNAPHIA FILIFOLIA E AVALIAÇÃO DA AÇÃO CONSERVANTE EM EMULSÕES**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Processos Químicos E Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Processos Químicos E Biotecnológicos.

Data de aprovação: 21 de Dezembro de 2020

Prof.a Tatiana Shioji Tiuman, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Juliana Bernardi Wenzel, Doutorado - Universidade Federal do Paraná (Ufpr)

Prof.a Solange Maria Cottica, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 21/12/2020.

AGRADECIMENTO

Agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, ao seu corpo docente, à direção e à administração.

RESUMO

O uso de extratos vegetais pelo homem é comum desde os tempos mais remotos e atualmente algumas de suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes são exploradas cientificamente, podendo ter utilização em formulações farmacêuticas, cosméticas, agrícolas e alimentares. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos e frações de *Pterocaulon angustifolium*, *Praxelis sanctopaulsensis* e *Disynaphia filifolia* e verificar a ação conservante da fração diclorometano de *P. angustifolium* em emulsões por estudos de estabilidade. Os extratos brutos foram preparados com etanol pelo processo de maceração em seguida, foi realizado o fracionamento por partição utilizando hexano, diclorometano, butanol, acetato de etila, butanol e metanol e água. Para a determinação da atividade antimicrobiana foi utilizada a técnica de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bacteriana Mínima (CBM) utilizando bactérias Gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) e Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexnerii* e *Klebsiella pneumoniae*). Foi realizado o estudo de tempo de morte bacteriana para *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. flexnerii* utilizando a fração diclorometano de *P. angustifolium* (PA-DCM). Na avaliação do perfil antioxidante foram realizados os métodos DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e FRAP (poder antioxidante de redução do ferro). Para avaliar a ação conservante da PA-DCM em emulsões foram desenvolvidas cinco formulações: F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidantes e antimicrobianos sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com antimicrobianos sintéticos e 0,05% de PA-DCM) que foram submetidas aos testes de estabilidade preliminar e acelerada por 28 dias. Em relação aos resultados de CIM e CBM observou-se que a fração diclorometano de *P. angustifolium* apresentou maior relevância inibindo o crescimento de *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. flexnerii* e com ação bactericida contra as mesmas, exceto para *B. cereus* que demonstrou apenas ação bacteriostática. Estes resultados foram confirmados na avaliação da curva do tempo morte dos microrganismos. Na avaliação da atividade antioxidante utilizando a técnica de DPPH, a fração acetato de etila de *P. angustifolium* se destacou e apresentou resultado de 1127,78 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$, enquanto que para o FRAP a fração acetato de etila de *P. sanctopaulsensis* mostrou atividade de 1704,296 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$. Para a fração diclorometano de *P. angustifolium* seu resultado no método de DPPH foi de 1001,11 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ e no método FRAP foi de 339,56 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$. PA-DCM foi utilizada no desenvolvimento das emulsões, que foram expostas a estabilidade preliminar e apresentaram resultados de aspecto, cor, odor, microscopia, pH e condutividade inalteradas, assim como não houve separação de fases após centrifugação das amostras. Em seguida, as emulsões foram expostas a estabilidade acelerada e apresentaram-se estáveis no período de 28 dias sob temperaturas de 25°C e 45°C nas análises de aspecto, cor, odor, microscopia, pH, condutividade, índice de acidez, DPPH, tamanho de partícula, análises microbiológicas e ácidos graxos. Além disso, foi possível observar que PA-DCM impediu significativamente a proliferação microbiana nas emulsões. Desta forma, conclui-se que PA-DCM consiste em um produto natural que apresenta atividade antimicrobiana e antioxidante, assim como demonstra ação conservante quando aplicada em formulações do tipo de emulsão, que podem ser utilizadas nas áreas farmacêutica, agrícola, cosmética e alimentar.

Palavras chave: antimicrobiano, cinética de morte microbiana, antioxidante, emulsão, estabilidade, conservantes naturais.

ABSTRACT

The use of vegetal extracts by man is common since the most remote times and nowadays some of its antimicrobial and antioxidant properties are explored scientifically and can be used in pharmaceutical, cosmetic, agricultural, and food formulations. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of extracts and fractions of *Pterocaulon angustifolium*, *Praxelis sanctopaulsensis* and *Disynaphia filifolia* and to verify the conservative fraction of the dichlorometano fraction of *P. angustifolium* in emulsions for stability studies. The raw extracts were prepared with ethanol by the maceration process. Then, fractionation by partition was performed using hexane, dichloromethane, butanol, ethyl acetate, butanol, methanol and water. For the determination of the antimicrobial activity the technique of determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bacterial Concentration (MBC) was used using Gram positive bacteria (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*) and Gram negative bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexnerii* and *Klebsiella pneumoniae*). A bacterial time of death study was performed for *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *S. flexnerii* using the dichloromethane fraction of *P. angustifolium* (PA-DCM). In the evaluation of the antioxidant profile, DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) and FRAP (iron reduction antioxidant power) methods were performed. To evaluate the preservative action of PA-DCM in emulsions five formulations were developed: F1 (control), F2 (with 0.5% of PA-DCM), F3 (with antioxidants and synthetic antimicrobials), F4 (with 0.5% of PA-DCM and synthetic antioxidants) and F5 (with synthetic antimicrobials and 0.05% of PA-DCM) which were submitted to preliminary and accelerated stability tests for 28 days. Regarding the results of CIM and CBM it was observed that the dichloromethane fraction of *P. angustifolium* presented greater relevance inhibiting the growth of *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *S. flexnerii* and with bactericidal action against them, except for *B. cereus* which showed only bacteriostatic action. These results were confirmed in the evaluation of the time death curve of microorganisms. In the evaluation of the antioxidant activity using the DPPH technique, the ethyl acetate fraction of *P. angustifolium* stood out and showed a result of 1127.78 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$, while for FRAP, the ethyl acetate fraction of *P. sanctopaulsensis* showed activity of 1704.296 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$. For the dichloromethane fraction of *P. angustifolium* the result in the DPPH method was 1001.11 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ and in the FRAP method it was 339.56 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$. PA-DCM was used in the development of emulsions, which were exposed to preliminary stability and presented results of appearance, color, odor, microscopy, pH and conductivity unchanged, as well as no phase separation after centrifugation of the samples. The emulsions were then exposed to accelerated stability and were stable for 28 days at temperatures of 25°C and 45°C in analyses of appearance, color, odor, microscopy, pH, conductivity, acidity index, DPPH, particle size, microbiological analyses and fatty acids. Also, it was observed that PA-DCM significantly prevented microbial proliferation in emulsions. Thus, it is concluded that PA-DCM consists of a natural product that presents antimicrobial and antioxidant activity, as well as demonstrates preservative action when applied in emulsion type formulations, which can be used in pharmaceutical, agricultural, cosmetic and food areas.

Keywords: antimicrobial, microbial death kinetics, antioxidante, emulsion, stability, natural preservatives

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração da espécie <i>Pterocaulon angustifolium</i>	18
Figura 2 - Ilustração da espécie <i>Praxelis sanctopaulensis</i>	19
Figura 3 - Ilustração da espécie <i>Disynaphia filifolia</i>	20
Figura 4 - Mecanismo geral da oxidação lipídica, onde RH- ácido graxo insaturado, R°- radical livre, ROO° - Radical peróxido e ROOH – hidroperóxido.....	24
Figura 5 – Principais excipientes utilizados no desenvolvimento de emulsões.....	29
Figura 6 - Microdiluição em placa de 96 poços de fundo chato para verificação na concentração inibitória mínima do extrato bruto e suas frações frente as bactérias <i>Escherichia coli</i> ; <i>Salmonella enteritidis</i> ; <i>Shigella flexnerii</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Bacillus cereus</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	33
Figura 7 - Determinação da concentração bactericida mínima do extrato bruto e as frações que apresentaram concentração inibitória mínima para as bactérias <i>Escherichia coli</i> ; <i>Salmonella enteritidis</i> ; <i>Shigella flexnerii</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Bacillus cereus</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	34
Figura 8 - Realização da curva do tempo de morte microbiano da fração PA-DCM em sua CIM e CIM x 2 para as bactérias <i>Shigella flexnerii</i> ; <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Bacillus cereus</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; e <i>Klebsiella pneumonia</i>	36
Figura 9 - Curva de morte bacteriana com a concentração inibitória mínima (CIM) da fração PA-DCM, com duas vezes a concentração inibitória mínima (CIM x 2) e um controle.....	49
Figura 10 - Curva padrão de Trolox em $\mu\text{mol L}^{-1}$ para os métodos de DPPH e FRAP.....	51
Figura 11 - Resultado do teste de solubilidade das emulsões. No béquer da esquerda de cada figura temos uma gota de emulsão em óleo mineral. No béquer direita de cada figuras temos uma gota de emulsão em água deionizada.....	55
Figura 12 – Resultado do teste de molhabilidade realizado na membrana de nitrato de celulose (F1, F2, F3, F4 e F5), utilizando como padrão água deionizada e óleo mineral.....	56

Figura 13 – Resultado do teste de centrifugação das emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidante e antimicrobiano sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos), F5 (com antimicrobiano sintéticos e 0,05% de PA-DCM), realizados na estabilidade preliminar.....	58
Figura 14 - Resultado do teste de aspecto e cor das emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidante e antimicrobiano sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos), F5 (com antimicrobiano sintéticos e 0,05% de PA-DCM), no início e após o ciclo de gelo-degelo.....	59
Figura 15 - Microscopia óptica das formulações antes do gelo-degelo e após ser exposta aos ciclos de gelo-desgelo.....	60
Figura 16 – Resultado do teste de aspecto e cor das emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidante e antimicrobiano sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos), F5 (com antimicrobiano sintéticos e 0,05% de PA-DCM) expostas a estabilidade acelerada de 45°C.....	63
Figura 17 – Resultado da microscopia óptica das emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidante e conservantes sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com conservantes sintéticos e 0,05% de PA-DCM), expostas a estabilidade acelerada a 25°C por 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias, na ampliação de 40X.....	70
Figura 18 – Resultado da microscopia óptica das emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidante e conservantes sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com conservantes sintéticos e 0,05% de PA-DCM), expostas a estabilidade acelerada a 45°C por 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias, na ampliação de 40X.....	71
Figura 19 - Contagem de bactérias, fungos e leveduras em UFC mL ⁻¹ das emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidante e conservantes sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com conservantes sintéticos e 0,05% de PA-DCM), expostas a estabilidade acelerada.....	72
Figura 20 – Cromatograma dos ácidos graxos encontrados nas emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidante e conservantes sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com conservantes sintéticos e 0,05% de PA-DCM).....	75

Figura 21 - Cromatograma referência do óleo analisados para identificação dos ácidos graxos majoritários, presentes nas formulações (F1, F2, F3, F4 e F5).....94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporções em porcentagem e excipientes utilizados para o preparo de uma emulsão base.....	39
Tabela 2 - Composição das cinco formulações com suas respectivas concentrações em porcentagem, F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidante e antimicrobiano sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com antimicrobiano sintéticos e 0,05% de PA-DCM).....	40
Tabela 3 – Resultado da análise de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CIM) dos extratos e frações das plantas <i>Pterocaulon angustifolium</i> (PA-HEX – hexânica, PA-DCM – diclorometano, PA-BUT – butanólica, PA-AE – acetato de etila, PA-HM – hidrometanólica e PA-EB – extrato bruto), <i>Praxelis sanctopaulsensis</i> (PS-HEX – hexânica, PS-DCM – diclorometano, PS-AE – acetato de etila, PS-HM - hidrometanólica e PS-EB – extrato bruto) e de <i>Disynaphia filifolia</i> (DF-HEX – hexânica, DF-DCM – diclorometano, DF-BUT – butanólica, DF-AE – acetato de etila, DF-AQ – aquoso e DF-EB – extrato bruto) e mg mL ⁻¹	45
Tabela 4 - Atividade antioxidante dos extratos ou frações pelos métodos de DPPH e FRAP.....	52
Tabela 5 – Resultados referentes ao pH e condutividade das emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidantes e antimicrobianos sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com antimicrobianos sintéticos e 0,05% de PA-DCM) submetidas a estabilidade preliminar a 4 ± 2°C por 24 horas (Geladeira) e 45 ± 2°C por 24 horas (Estufa), após os 6 ciclos (12 dias).....	61
Tabela 6 - Resultados da estabilidade acelerada, referentes ao pH, condutividade, índice de acidez, DPPH e tamanho de partícula das emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidantes e antimicrobianos sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com antimicrobianos sintéticos e 0,05% de PA-DCM) submetidas a 25 °C por 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias.....	64
Tabela 7 - Resultados da estabilidade acelerada, referentes ao pH, condutividade, índice de acidez, DPPH e tamanho de partícula das emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidantes e antimicrobianos sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com antimicrobianos sintéticos e 0,05% de PA-DCM) submetidas a 45 °C por 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias.....	65

Tabelas 8 – Resultado de ácidos graxos das emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidante e conservantes sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com conservantes sintéticos e 0,05% de PA-DCM), no primeiro dia da estabilidade e após 28 dias expostas a 25°C e 45°C em porcentagem.....76

LISTA DE ABREVIACÕES

DMSO - Dimetilsulfóxido

RPM - Rotação por minuto

UV/Vis - Ultravioleta visível

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

UEM - Universidade Estadual do Maringá

UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

FA - Fase aquosa

FO - Fase oleosa

QSP – Quantidade suficiente para

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 PRODUTOS NATURAIS.....	16
3.2 FAMÍLIA <i>ASTERACEAE</i> : <i>Pterocaulon angustifolium</i> , <i>Praxelis sanctopaulensis</i> E <i>Disynaphia filifolia</i>	17
3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS.....	20
3.3.1 Microrganismos de importância médica.....	21
3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS VEGETAIS.....	23
3.5 EMULSÕES.....	26
3.6 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES.....	27
3.7 ESTABILIDADE.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 EXTRATOS DE <i>Pterocaulon angustifolium</i> , <i>Praxelis sanctopaulensis</i> E <i>Disynaphia filifolia</i>	31
4.2 MICRORGANISMOS.....	31
4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....	32
4.4 CURVA DE MORTE.....	34
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – DPPH.....	36
4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – FRAP.....	37
4.7 DESENVOLVIMENTO DA EMULSÃO.....	38
4.8 CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES QUANTO AO TIPO (O/A OU A/O).....	39
4.9 ANÁLISES PRELIMINARES DAS EMULSÕES.....	40
4.10 ESTABILIDADE.....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....	44
5.2 CURVA DE MORTE.....	48

5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	50
5.4 DESENVOLVIMENTO DA EMULSÃO.....	54
5.4.1 Caracterização das emulsões quanto ao tipo (O/A ou A/O).....	55
5.4.2 Análises preliminares das emulsões.....	57
5.5 ESTABILIDADE ACELERADA DAS EMULSÕES.....	62
5.5.1 Aspecto cor e odor.....	62
5.5.2 pH, condutividade, índice de acidez, DPPH, tamanho de partícula, microscopia óptica e análises microbiológicas.....	63
5.5.3 Ácidos graxos.....	75
CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	80
ANEXOS.....	94

1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais na cura de enfermidades sempre foi muito comum desde a antiguidade, sendo que, o interesse da população em geral por estes produtos vem crescendo, pois é uma fonte de saúde comparada aos produtos sintéticos (PAIVA et al., 2015).

Sendo assim, muitas espécies são alvos de importantes pesquisas científicas, pela representatividade significativa na biodiversidade e nos postulados farmacológicos. Os extratos são relevantes por sua contribuição como fonte natural de fármacos também por serem uma alternativa interessante na obtenção de moléculas bioativas que possam de alguma forma constituirlos. Além da importância farmacêutica e cosmética, os extratos vegetais têm largo emprego na produção de alimentos industrializados, por conter moléculas e propriedades ativas que se apresentam com potencial ativador de sabor, cor, aroma ou da conservação de alguns destes produtos (QUEIROZ et al., 2015).

Conforme Santos et al. (2017) a Família *Asteraceae* se destaca significativamente em termos de número e mecanismos de adaptação, tendo inclusive elevada importância econômica. Composta por mais de 24,000 espécies, entre as quais algumas têm relevância cosmética, medicinal, alimentícia, agrícola ou na cultura humana. Esta família possui diversas espécies funcionais (MIODUSKI e MORO, 2011), é amplamente distribuída pelo mundo, especialmente em ervas e arbustos apresenta propriedades antibacterianas, antioxidantes, antifúngicas e sua principal característica é um odor agradável, o que facilita sua inserção no mercado (AMARAL, 2015; DE MELO et al., 2016).

Sendo assim, ao conhecer melhor o perfil antimicrobiano e antioxidante dos extratos naturais torna possível entender sua aplicabilidade enquanto conservantes de ampla utilização em produtos como medicamentos, cosméticos e alimentos (CALEJA et al., 2017; LEÃO et al., 2017). Também, conhecer o perfil antimicrobiano e antioxidante dos extratos vegetais é de suma relevância no desenvolvimento de formulações de origem natural, os quais podem apresentar efetiva atuação no combate a doenças bacterianas e como conservantes em alimentos. As indústrias em geral têm grande interesse na descoberta de novos agentes com potencial antimicrobiano e antioxidante a partir de extratos naturais (GARCIA, 2016) o que justifica esta pesquisa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos e frações de *Pterocaulon angustifolium*, *Praxelis sanctopaulsensis* e *Disynaphia filifolia* e verificar a ação conservante da fração diclorometano de *P. angustifolium* em emulsões por estudos de estabilidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória e bactericida mínima de extratos brutos e frações de *Pterocaulon angustifolium*, *Praxelis sanctopaulsensis* e *Disynaphia filifolia*;
- Construir a curva de cinética de morte bacteriana para o(s) extrato(s) com melhor atividade;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos e frações utilizando os métodos DPPH (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro);
- Desenvolver uma emulsão com o extrato ou fração vegetal que melhor apresentar potencial antimicrobiano e antioxidante;
- Realizar estudos de estabilidade preliminar e acelerada (25 e 45 °C por 28 dias) e verificar a ação conservante na emulsão (aspecto, cor, odor, pH, condutividade elétrica, índice de acidez, DPPH, tamanho de partícula, microscopia e análise microbiológica);
- Avaliar a estabilidade oxidativa das emulsões pela identificação e quantificação de ácidos graxos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUTOS NATURAIS

Desde os tempos mais remotos os recursos naturais fazem parte da história da evolução humana, sendo eles oriundos de origem mineral, vegetal e animal (DA SILVA, 2018). Na antiguidade, os extratos vegetais eram utilizados em cerimônias religiosas, com funções medicinais e cosméticas (IBERIAN COPPERS S.A., 2016).

A população utiliza diversas partes da planta, das raízes às flores, na produção caseira de emplastos, ceras, chás e xaropes entre outros, com técnicas rudimentares de infusão, extração oleaginosa, preparo de compostos para uso oral ou tópico. A flora brasileira apresenta plantas com tradicional uso terapêutico, tendo em seus extratos, propriedades bioativas de aplicação antimicrobiana, antioxidante, entre outras (SAAD et al., 2013).

Os extratos são preparações com composições variadas, sendo obtidos por destilação a vapor, prensagem a frio ou extração com solventes. Os processos mais comuns usados para a extração também podem envolver maceração, infusão, decocção, digestão, percolação e destilação (GOUVEA; ROSENTHAL; FERREIRA, 2017).

Sendo assim, muitas espécies são alvo de importantes pesquisas científicas, pela representatividade significativa na biodiversidade e nos postulados farmacológicos. Conforme Queiroz et al., (2015), os extratos são relevantes por sua contribuição como fonte natural de fármacos e também por serem uma alternativa interessante na obtenção de moléculas bioativas que possam de alguma forma constituirlos. Além da importância farmacêutica e cosmética, os extratos vegetais têm largo emprego na produção de alimentos industrializados, por conter moléculas e propriedades ativas que se apresentam com potencial ativador de sabor, cor, aroma ou da conservação de alguns destes produtos.

A capacidade de manter características adequadas ao consumidor é outra condição essencial para o sucesso no segmento alimentar e certamente a segurança alimentar passa pelo perfil antimicrobiano e antioxidante (ALBUQUERQUE, 2009).

Para atender esta procura dos consumidores e também aumentar a competitividade do mercado por meio da diferenciação de produtos, as indústrias de alimentos, medicamentos, cosméticos, produtos agrícolas, da pecuária e as instituições de pesquisa buscam conservantes naturais como alternativas aos sintéticos (GOUVEA; ROSENTHAL; FERREIRA, 2017).

Nesse aspecto Zopellaro et al. (2019), apresentam que o uso de extratos vegetais enquanto antimicrobiano e antioxidante pode reduzir não somente impactos no meio ambiente como nas

perdas econômicas de uma empresa. Diante da biodiversidade floral do país, é fundamental conhecer quais as propriedades vegetais viáveis no combate à ação bacteriana e processo oxidativo.

3.2 FAMÍLIA *ASTERACEAE*: *Pterocaulon angustifolium*, *Praxelis sanctopaulensis* E *Disynaphia filifolia*

Conforme Santos et al. (2017), a Família *Asteraceae* (também denominada *Compositae*) se destaca significativamente em termos de número e mecanismos de adaptação, tendo inclusive elevada importância econômica.

Composta por mais de 24000 espécies, com provável origem na África, e atualmente com mais de 1000 endêmicas (NAKAJIMA et al., 2015), entre as quais algumas têm relevância cosmética, medicinal, alimentícia, agrícola ou na cultura humana. Esta família possui muitas espécies funcionais, bem distribuídas em áreas campestres ou florestais do Brasil (MIODUSKI e MORO, 2011), difundidas na sociedade em geral e frequentemente encontrada no Paraná. De fato, no Paraná a família *Asteraceae* predomina em algumas das suas regiões de paisagens naturais, como as formações campestres (GROKOVISKI; CERVI; TARDIVO, 2009).

A característica geral mais notável das *Asteraceae* é que as flores são agrupadas e se assemelham a flores individuais. Cada um desses agrupamentos é normalmente subtendido por um involúcro de pequenas folhas modificadas (brácteas). Além disso, em mais da metade dos membros da família, as flores na fileira mais externa têm uma corola modificada, sendo ela principalmente plana e alongada, que se assemelha a uma pétala individual. Assim, as pétalas de uma margarida ou girassol são na verdade as flores mais externas. As folhas das *Asteraceae* são simples ou ocasionalmente compostas, e seu arranjo ao longo do caule pode ser oposto, alternado ou, menos comumente, torcido. Os membros das *Asteraceae*, empregam um sistema de polinização conhecido como êmbolo ou secundário e o mesmo é realizado por diversos agentes, mais comumente por insetos. Os membros desta família produzem um tipo de fruta chamada aquênio, que é seca e com semente única e não abre na maturidade (ASTERACEAE, 2019).

Conforme Amaral (2015) e De Melo et al. (2016), além de ser amplamente distribuída pelo mundo, especialmente em ervas ou arbustos, apresenta espécies com propriedades antibacterianas, antioxidante, fungicidas e sua principal característica é um odor agradável, o que facilitou sua inserção no mercado, dando sua versatilidade de uso.

O gênero *Pterocaulon*, em geral, apresenta propriedades antissépticas, podendo combater microrganismos, além de possuir estratégias adaptativas importantes à sua perpetuação, como a fixação radicular em diferentes tipos de solo. Sendo então resistente e de fácil plantio, acaba por ser uma alternativa no combate a agentes patogênicos que afetam outras plantas ou mesmo o ser humano (MELO JR.; BOEGER, 2018).

Segundo Fernandes; Ritter (2009), a espécie *Pterocaulon angustifolium* não apresenta nome popular e trata-se de um subarbusto de até 70 cm de altura, conforme Figura 1, nativo, mas não endêmico no Brasil, encontrada em bordas e áreas marginais de matas. Espécies desse gênero são utilizadas na medicina tradicional no tratamento de diversas doenças, entre elas, micoses, artrite, além de acnes e picadas de insetos (MORENO et al., 2019).

Acerca dessa espécie, Santos et al. (2016) abordam que a mesma aponta a existência de propriedades antioxidantes, o que reforça sua pertinência no estudo do emprego de extratos vegetais no desenvolvimento de formulações.

Figura 1- Ilustração da espécie *Pterocaulon angustifolium*.

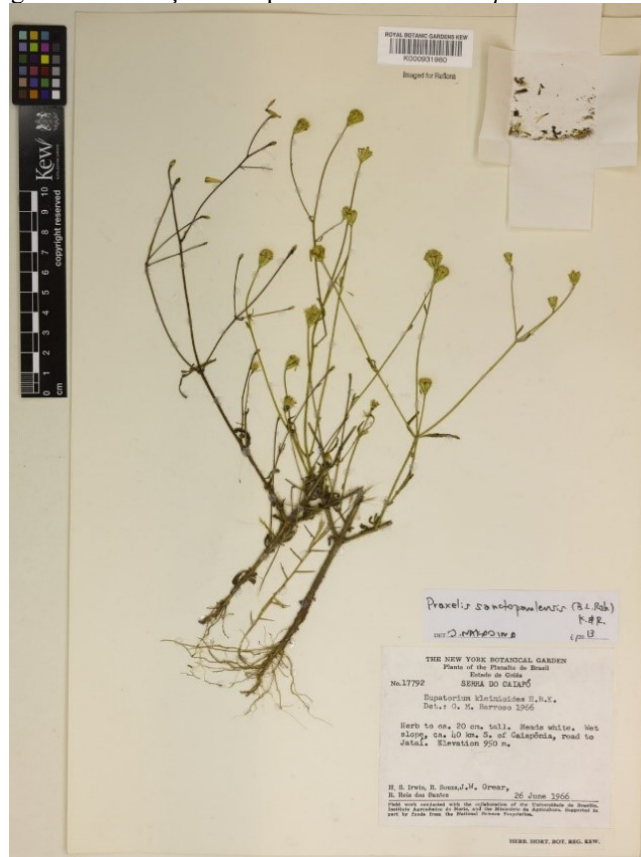


Fonte: Lima; Matzenbacher, 2008.

Outra espécie desta família, *Praxelis sanctopaulensis* (Figura 2), também não apresenta nome popular, porém, apresenta pólen de porte médio de formato esferoidal, de caráter odorífero marcante, indicando a possibilidade de bom potencial na inibição a microrganismos

(ABREU et al., 2013). Sua relevância para o homem também remete ao avanço econômico no que tange à agricultura, tendo alto valor de importância na estruturação topográfica, útil ao plantio de outras espécies em campo de composição mais rochosa, o litossolo (DA SILVA et al., 2016).

Figura 2 - Ilustração da espécie *Praxelis sanctopaulensis*.



Fonte: Roskov Y. et al., 2018.

Entre as espécies das asteráceas, do território brasileiro, Hattori (2014) explana que o gênero *Disynaphia filifolia* (Figura 3) se encontra distribuída especialmente nas regiões centro oeste e sul do país, concentrado no Mato Grosso do Sul, Santa Catarina e Paraná.

Além disso, sabe-se que este gênero tem proximidade com o gênero *Praxelis*, em relação a algumas questões filogenéticas. Seu potencial econômico remete à síntese de compostos odoríferos, de potencial farmacêutico. Chierici et al. (2018) ressaltam em seus estudos que a *D. filifolia* possui bioativos de caráter aromático com significativa acidez, podendo apresentar ação contra certos microrganismos.

Figura 3 - Ilustração da espécie *Disynaphia filifolia*.



Fonte: Roskov Y. et al., 2018.

A literatura expõe poucos estudos referentes a aplicação ou composição das três espécies *Pterocaulon angustifolium*, *Praxelis sanctopaulensis* e *Disynaphia filifolia*.

3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS

Grande parte da população mundial faz uso de tratamentos sugeridos pela medicina natural ou, como também é conhecida, medicina tradicional. Portanto, o efeito benéfico gerado por esse uso medicinal das plantas vem despertando interesse junto aos pesquisadores há muito tempo. Um grande número de plantas permanece desconhecido tanto do ponto de vista medicinal quanto do ponto de vista químico e farmacológico. Na atualidade, um dos grandes problemas enfrentados pela ciência médica está no aumento dos processos de resistência de microrganismos de interesse médico a fármacos disponíveis no mercado. Crescentes casos de resistência a antimicrobianos não estão ocorrendo em focos isolados no planeta. Esse problema tem se tornado um caso de saúde pública internacional. Essas reações de resistência microbiana se dão pelo uso inadequado de antimicrobianos pela população, sem o controle ou consulta prévia aos profissionais da saúde qualificados. Desse modo, o fenômeno da resistência microbiana exige o uso de antimicrobianos mais potentes ou ainda o uso de dois ou mais

medicamentos para o combate de tais bactérias. Estes problemas geram altos custos para o sistema de saúde pelo uso de antibióticos mais fortes e caros, o que acarreta custos extras para obtenção destes (GELLEN; SILVA, 2016).

Os antibióticos podem ser bactericidas ou bacteriostáticos, causam a morte ou inibem o crescimento microbiano respectivamente, com a inativação de enzimas, incluindo aquelas envolvidas na produção de energia e na síntese de componentes estruturais, ou até a destruição do material genético (ALMEIDA et al., 2015). Alexandre Fleming, em 1928 trouxe um marco fundamental no mundo dos antibióticos, onde encontrou a atividade da penicilina. A penicilina G, ou benzilpenicilina então descrita como antibiótico em 1929, foi utilizada como agente terapêutico a partir de 1940 (GUIMARÃES et al., 2010).

Durante a Segunda Guerra Mundial, quando houve um aumento da industrialização da penicilina, ocorrendo um rápido aumento na descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos, sob uma necessidade iminente de combater e controlar a difusão de infecções e transmissão de microrganismos, evidentemente facilitada em tempos de conflito. Entre os anos de 1940 e 1960, produtos naturais foram selecionados e vários deles obtiveram atividade antimicrobiana (GUIMARÃES et al., 2010).

Atualmente, além da busca de novos medicamentos com propriedades antimicrobianas há um aumento na busca por alimentos mais saudáveis e seguros. Para atender esta demanda do mercado, as indústrias de alimentos têm utilizado a conservação, que consiste na substituição de antimicrobianos obtidos através de síntese química, por compostos naturais de origem vegetal, com atividade antimicrobiana comprovada (BIASUS et al., 2016). Este interesse em estudar plantas com potencial antimicrobiano, não é apenas pelo aumento da resistência microbiana, mas também pela crescente necessidade de substituir conservantes artificiais nos alimentos por agentes naturais. As substâncias naturais, podem ter capacidade bacteriostática e bactericida, o que lhes permite retardar o processo de deterioração, aumentando assim a vida útil dos alimentos (SANTOS; RAMOS; MIYAGUSKU, 2017).

3.3.1 Microrganismos de importância médica

A *Escherichia coli* é uma bactéria pertencente à Família *Enterobacteriaceae* e seu principal habitat é no trato intestinal humano e animal. Ela é potencialmente patogênica e tem uma grande importância no funcionamento fisiológico do organismo humano, já que a mesma faz parte da microbiota intestinal (SOUZA, 2016). São bastonetes gram negativos capazes de

fermentar lactose e anaeróbios facultativos. São frequentemente utilizados como indicadores de contaminação fecal em alimentos e água (PAULA, 2014).

Também da Família das *Enterobacteriaceae*, a *Salmonella enteritidis* é um bastonete gram negativo, móvel, capaz de forma ácido, predominante de isolamento em humanos e animais (MS, 2011). É um dos principais agentes envolvidos em surtos de intoxicação alimentar. Resulta em diversas manifestações, incluindo febre entérica, bacteremia e gastroenterites (OLIVEIRA et al., 2013).

Semelhante aos mecanismos de *Salmonella*, *Shigella flexnerii*, possui características gerais de bactérias de ação entérica e gastrointestinal, crescendo entre 10 °C e 48 °C e pH ideal de 6 a 8, embora possa apresentar crescimento em pH 5. Prefere ambiente mais alcalino, mas não é afetada pela acidez estomacal, se proliferando no intestino delgado e causando lesões no intestino grosso. Também destrói o tecido da mucosa intestinal e causa diarreia intensa com sangue e muco por transmissão fecal-oral ou indiretamente, pelo consumo de alimentos ou água contaminados, podendo ocorrer pela ingestão de alimentos manipulados sem a higiene apropriada (DA CUNHA et al., 2017).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria do grupo das fluorescentes, é uma bactéria patogênica oportunista cujo habitat natural é a água, incluindo ambientes oligotróficos como é o caso da água mineral natural. Esta bactéria é reconhecida pela sua elevada capacidade de adquirir resistência a antibióticos e pela diversidade de características morfológicas e fisiológicas, designadas por fatores de virulência, que lhe confere a capacidade de colonizar todos os tecidos humanos, sendo hoje um dos agentes patogênicos mais significativo, associado sobretudo a patologias respiratórias (PEREIRA, 2013). Apresenta-se em forma de bacilos gram negativos, com aproximadamente 0,5 a 0,8 µm de comprimento e 1,5 a 3,0 µm de largura. É uma bactéria termolábil, hidrofílica, aeróbica, não fermentadora, móvel e que está distribuída pelo ambiente. Outras características importantes da *P. aeruginosa* são a emissão de odor de fruta adocicada e em testes bioquímicos, a apresentação de oxidase positiva, lisina descarboxilase negativo, cetrimida positivo, malonato positivo, citrato positivo, indol negativo, oxida a maltose e lactose e reduz nitrato a nitrito (DINI, 2016).

Bacillus subtilis é um bacilo gram positivo, de solo, não colonizador de tecidos, formador de esporos. Por muito tempo, consideradas bactérias estritamente aeróbias, porém, estudos conduzidos nos últimos anos, mostraram que tal espécie pode também crescer em ambientes anaeróbicos (EHRHARDT, 2015).

Bacillus cereus é uma bactéria gram positiva, produtor de toxinas, aeróbio facultativo, formador de endósporo e encontra-se disseminado pela natureza. Sua patogenicidade está

associada a produção de toxinas (diarreicas, eméticas), hemolisinas e diferentes tipos de fosfolipase C (LENTZ, 2014). São transmitidos por alimentos contaminados pelos seus esporos bacterianos (BATISTA et al., 2018).

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram positiva, esférica do grupo dos cocos, seu habitat natural é pele e nas fossas nasais de pessoas. São imóveis e não esporulados, suas colônias são cremosas e opacas. Podem causar doenças em indivíduos em condições favoráveis à bactéria, sendo patologias sintomáticas ou assintomáticas, como pneumonia, meningite, endocardite, entre outras. O que se pode destacar do *S. aureus* é o alto índice de resistência a diversos antibióticos, sobretudo aos betalactâmicos e meticilina (TORRES et al., 2017), devido a sua enorme capacidade de adaptação e resistência, tornou-se uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias (SANTOS et al., 2007).

A bactéria *Klebsiella pneumoniae* é gram negativa e desenvolve infecções de difícil tratamento, pois com eficiência atingem a circulação sanguínea (DA SILVA et al., 2018). Sua notável resistência a medicamentos como penicilina, cefalexina e ciprofloxacino, por exemplo, dificultam a recuperação do enfermo e, além disso, seus esquemas de transmissão e formação colonial facilitam a contaminação num ambiente de fragilidade em termos de saúde, ou seja, onde já há pessoas debilitadas.

Como relatou Alencar et al. (2016), *Klebsiella pneumoniae* é considerada altamente transmissível, entre pacientes imunodeprimidos e por meio de secreções ou excretas, ocasionando infecções no trato respiratório, urinário ou mesmo eczemas entre internados. Essa bactéria é a produtora mais comum de carbapenemases (KPCs), uma classe de enzimas bacterianas capazes de inativar carbapenêmicos (ROSA et al., 2015). Diante desse quadro é um microrganismo de relevância farmacêutica, sendo interessante ter seu perfil conhecido, pois segundo Da Siva et al. (2019), a resistência bacteriana a medicamentos é problema de difícil resolução, favorecendo infecções e aumentando custos a saúde pública, principalmente no meio hospitalar.

3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS VEGETAIS

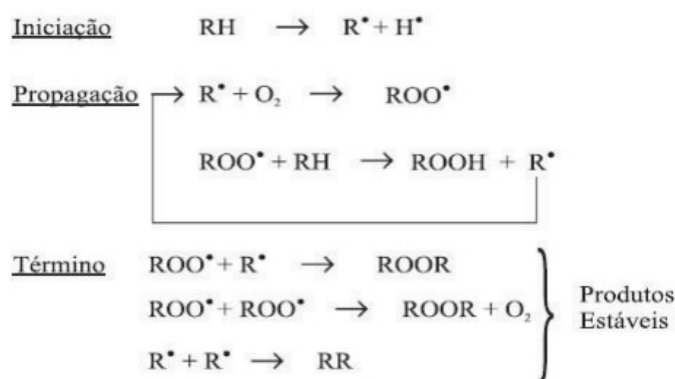
Os antioxidantes são definidos como substâncias que mesmo presentes em baixas concentrações atrasam ou inibem o processo de oxidação. Por este motivo, os mesmos estão sendo muito estudados e amplamente utilizados pelas indústrias de alimentos, medicamentos, cosméticos, agrícolas e pecuária os quais as pesquisas são acerca da atividade a partir de

extratos vegetais. Também são classificados em dois grupos, sendo eles antioxidantes primários e secundários. (SILVA et al., 2019).

Os primários são os que deixam o produto mais estável termodinamicamente, pela interrupção da cadeia da reação na oxidação, doando elétrons aos radicais livres, podendo ser sintéticos como BHA (butilhidroxianisol) e BHT (butilhidroxitolueno) ou naturais (como por exemplo: tocoferóis e carotenóides). Já os antioxidantes secundários são compostos que reduzem a taxa de iniciação da oxidação por decompor hidroperóxidos e, promovem a atividade antioxidante dos primários. Pode-se citar como secundários o ácido cítrico, ácido ascórbico e ácido tartárico (GONÇALVES, 2008).

O processo oxidativo está dividido em três etapas, conforme Figura 4. A primeira, a iniciação, é onde acontece a retirada de um hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo e a consequente formação de radicais livres, em condições de luz e calor favoráveis. A segunda é denominada propagação, onde ocorre conversão dos radicais livres susceptíveis ao ataque do oxigênio a outros radicais, estes são os produtos primários da oxidação, sendo eles peróxidos e hidroperóxidos. Nesta etapa os radicais formados atuam como propagadores da reação este processo é auto catalítico. Por fim, a etapa do término, na qual dois radicais se combinam, formando um produto estável obtido por cisão e rearranjo dos peróxidos, sendo secundário da reação (TIVERON, 2010).

Figura 4 - Mecanismo geral da oxidação lipídica, onde RH- ácido graxo insaturado, R°- radical livre, ROO° - Radical peróxido e ROOH – hidroperóxido



Fonte: Ramalho e Jorge, 2006.

Os antioxidantes de origem vegetal têm bastante importância na percepção, econômica e científica, sendo comuns nas formulações medicinais, cosméticas e alimentícias, entre outras, já que produzem menores impactos na natureza, em muitos casos podem também ser uma

alternativa economicamente satisfatória às empresas em relação aos sintéticos (OLIVEIRA et al., 2009).

O uso de extratos vegetais na fabricação de insumos para melhoria da estética é comum, pois normalmente apresentam ácidos graxos similares aos presentes na derme, podendo constituir formulações de combate aos radicais livres, os quais são de caráter pró-envelhecimento (COELHO, 2017).

Também, os antioxidantes são considerados coadjuvantes na redução do risco de desenvolvimento de doenças como aterosclerose, diabetes, hipertensão, doenças coronarianas e neurológicas degenerativas. Os antioxidantes, têm sido alvo de muitos estudos, devido às suas ações biológicas associadas à prevenção de doenças e ao seu potencial curativo (SANTOS et al., 2016), além de retardarem ou impedirem auto-oxidação, sendo muito utilizados em alimentos, pois inibem ou interrompem a propagação da formação de radicais livres (ACHKAR et al., 2013).

Os alimentos estão sujeitos a sofrerem reações de oxidação, essas reações podem resultar na alteração do seu valor nutricional, e nos seus padrões de qualidade, como o odor, a cor, o sabor e a textura. Esta oxidação se deve a oxidação sofrida pelos lipídios que ocorre durante o processamento, a distribuição, o armazenamento e o preparo dos alimentos. Essas reações geram odores e sabores indesejáveis, o que torna os alimentos impróprios para o consumo, também provocam as alterações nutricionais que afetam a integridade e a segurança, porque ocorre a produção de compostos potencialmente tóxicos (BORDIM, 2020).

Os antioxidantes alimentares sintéticos são produtos de baixo custo e fácil uso, o que os tornam um dos métodos mais comuns de conservação. Embora existam diferentes grupos de antioxidantes alimentares, todos têm um mesmo objetivo em comum, conservar os alimentos pelo maior tempo possível sem alterá-lo (ACHKAR et al., 2013).

Existem vários métodos diferentes desenvolvidos para medir a atividade antioxidante. O ensaio DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um dos métodos mais comumente empregados, porque é simples, eficiente e barato. O método original foi desenvolvido por Blois em 1958 e teve modificações introduzidas por Brand-Williams, Cuvelier e Berset em 1995. O DPPH é um radical livre estável que apresenta uma cor púrpura/violeta e uma absorção na faixa de 515 a 520 nm. Na presença de compostos antioxidantes, o DPPH pode aceitar um átomo de hidrogênio do antioxidante, para ser convertido em uma molécula de DPPH mais estável. Como a forma reduzida de DPPH é amarela pálida, é possível determinar a atividade antioxidante estudando a mudança de cor espectrofotometricamente. Quanto maior a

capacidade de eliminação de radicais livres de um composto antioxidante, mais redução de DPPH e menos cor púrpura existem na amostra (CARMONA-JIMÉNEZ et al., 2014).

Outro método é o ensaio de avaliação do poder antioxidante redutor férrico (FRAP), no qual é avaliada a partir de uma reação redox que ocorre entre o substrato e o Fe (III), produzindo Fe (II). A reação envolve a formação de um complexo TPTZ (2,4,6-Tris(2piridil)-s-triazina) com Fe (III), de cor amarela e na presença de um antioxidante, o ferro presente é reduzido, originando $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{3+}$, de coloração azul escura, essa redução é monitorada espectrofotometricamente e absorve a radiação eletromagnética no comprimento de onda de 593 nm (MARTINS et al., 2013). O ensaio FRAP demonstrou ser aplicável a uma ampla gama de antioxidantes, no entanto, sua taxa de reação e rendimento final podem variar para cada composto antioxidante (JONES et al., 2017).

3.5 EMULSÕES

As emulsões são formadas por dois ou mais líquidos imiscíveis, são sistemas em que um líquido está disperso em outro na forma de gotículas, geralmente estabilizadas por um surfactante. As mesmas podem ser classificadas conforme sua fase contínua: água em óleo (a/o) apresenta gotículas de água dispersas em óleo, enquanto óleo em água (o/a) consiste em gotículas de óleo dispersas em água. As emulsões são sistemas complexos e de vasta aplicabilidade (SOUSA et al., 2011).

Conforme Kulmann et al. (2018), as microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis, visualmente opacos, constituídos por agregados esféricos dispersos em uma fase contínua de um solvente imiscível com a fase dispersa e apresentam tamanho de 100 nm à 1000 μm .

Por sua vez, as nanoemulsões se configuram em uma emulsão cujos diâmetros das gotículas dispersas têm em média 100 nm ou menos, podendo ter componentes ativos em suas partículas, possivelmente facilitando a entrada do mesmo na superfície receptora (PEREZ et al., 2016).

As emulsões apresentam aplicações potenciais nas indústrias de tintas, alimentos, cosméticos e farmacêutica. Tem sido dada atenção especial à emulsão como veículo para transportar fármacos para o corpo, pois aumentam a biodisponibilidade desses compostos. As emulsões óleo-em-água são comumente usadas como bases de medicamentos e para fins cosméticos gerais. Valor adicional pode ser dado a essas formulações incluindo ingredientes ativos com efeitos cosméticos específicos. Preparações de emulsão cosmética particularmente

vantajosa são obtidas quando antioxidantes e antimicrobianos são usados como ingredientes ativos. Há uma atenção crescente nos antimicrobianos e antioxidantes naturais presentes nas plantas. Devido às suas propriedades benéficas e terapêuticas, os extratos naturais de plantas e seus produtos derivados têm sido frequentemente incluídos na forma de emulsões nas atuais formulações e preparações farmacêuticas e cosméticas (KHAN et al., 2013).

Devido às características estruturais, as emulsões possuem alto potencial para aplicação em alimentos, como modulação de aromas e sabores indesejáveis, produção de alimentos com baixo conteúdo calórico-lipídico (diet e light), transporte e liberação controlada de componentes bioativos e proteção das substâncias de oxidação e da ação de certas enzimas, após sua ingestão e durante o processo digestivo (PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015).

3.6 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES

As necessidades do mundo atual acerca do uso de extratos vegetais exigem não somente viabilidade, como assertividade. Isto é, não basta limitar-se apenas à retirada de extratos e seu uso na fabricação de compostos para fins terapêuticos. A compreensão dos mecanismos que envolvem o processo do início ao fim, o surgimento e claro, o aperfeiçoamento dos meios tanto do produto final quanto das metodologias inerentes são pontos importantes, indiscutivelmente necessários ante aos problemas relacionados à aquisição e manipulação de extratos (SILVA et al., 2020). É preciso trabalhar em cima de comprovação científica da ação determinada e especificidade de cada produto a ser utilizado, sabendo que por mais natural que o composto seja, qualquer um pode apresentar componentes de baixa aceitação pelo organismo humano devido alguma toxicidade em sua constituição (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Nas formulações de emulsões, as proporções entre óleo e água, e entre os demais componentes bem como a composição do óleo utilizado é um fator que influencia no produto final e deve ser escolhido conforme o sistema final desejado. A fase oleosa da emulsão pode ser formada por materiais lipídicos de origem vegetal, animal ou mineral, porém os óleos vegetais estão entre os ingredientes mais utilizados, tanto pelo apelo ao uso de produtos naturais, quanto pela multiplicidade de perfis químicos de ácidos graxos, que lhe conferem diferentes graus de estabilidade e promovem sensações e efeitos diversos (AGOSTINHO, 2017). Dessa forma, a escolha dos componentes da emulsão depende diretamente das propriedades e das substâncias presentes na formulação. A escolha dos emulsificantes e surfactantes requer muito além de experiência, pois apresentam a ampla variedade desses agentes atualmente disponíveis no mercado (CASTRO, 2014).

O monoestearato de sorbitano (Span 60) é uma série de misturas de ésteres parciais de sorbitol e seus mono e dianidretos com ácidos graxos, sua fórmula química é $C_{24}H_{46}O_6$. São amplamente utilizados em cosméticos, produtos alimentícios e formulações farmacêuticas orais e tópicas como surfactantes não-iônicos lipofílicos. Em formulações farmacêuticas, eles são usados principalmente como agentes emulsificantes na preparação de cremes, emulsões e pomadas para aplicação tópica. Quando usados isoladamente produzem emulsões e microemulsões estáveis de água em óleo, mas são frequentemente usados em combinação com proporções variáveis de polissorbato para produzir emulsões ou cremes. O monoestearato de sorbitano é um sólido de cor creme, conforme Figura 5, geralmente solúvel e dispersível em óleo e muito solúvel em solventes orgânicos. Na água, embora insolúveis, são geralmente dispersíveis. São considerados materiais não tóxicos e não irritantes, no entanto, houve relatos ocasionais de reações cutâneas hipersensíveis após a aplicação tópica de produtos contendo ésteres de sorbitano (ZHANG, 2009).

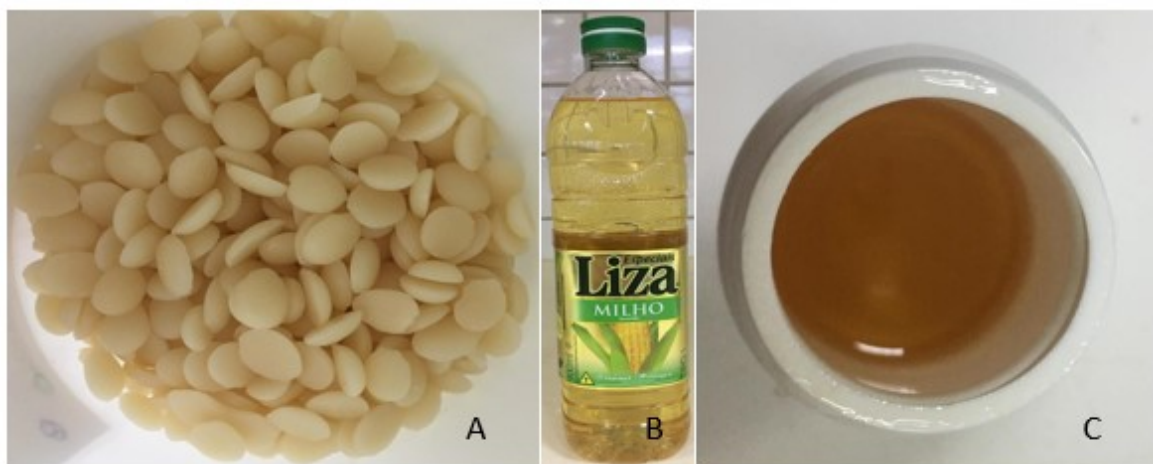
O óleo de milho é usado principalmente em formulações farmacêuticas como solvente para injeções intramusculares ou como veículo para preparações tópicas. Emulsões contendo até 67% de óleo de milho também são usadas como suplementos nutricionais orais. Quando combinado com surfactantes e polímeros formadores de gel, é usado para formular vacinas veterinárias. O óleo de milho tem uma longa história de uso como óleo comestível e pode ser usado em comprimidos ou cápsulas para administração oral. É um líquido oleoso, claro, de cor amarela clara, com um leve odor característico, conforme Figura 5. O óleo de milho é geralmente considerado um material relativamente não tóxico e não irritante, com uma extensa história de uso na preparação de alimentos (ALEXANDER, 2009).

Os principais ácidos graxos que compõem o óleo de milho são: ácido linoleico (34–62%), ácido oleico (24–42%), ácido palmítico (9–14%), ácido esteárico (0,5–4%) e ácido linolênico (< 2%) (KIM et al., 2010). Os constituintes menores mais significativos compreendem os fosfolipídios, os glicolipídios e a fração insaponificável, constituída principalmente de tocoferóis, fitosteróis e carotenoides. O teor de matéria insaponificável no óleo de milho, 1,3–2,3% é mais alto que em outros óleos vegetais. Cerca de 60% da matéria insaponificável é composta de esteróis, a maioria dos quais se encontra esterificada aos ácidos graxos. Entre os esteróis predominantes podem ser citados o β -sitosterol, campesterol e estigmasterol. Apesar de altamente poli-insaturado, o óleo de milho é bastante estável, pois contém altos níveis de antioxidantes naturais como tocoferóis, tocotrienóis, ácido ferúlico e ubiquinonas (coenzima Q), e também está associado ao alto teor de ácido linoleico e baixa porcentagem de ácido linolênico, o que leva vantagem em relação ao óleo de soja. A alta estabilidade do óleo de milho

pode, ainda, estar parcialmente relacionada à distribuição não casual dos ácidos graxos nas moléculas dos triacilgliceróis. A maior parte dos ácidos graxos insaturados encontra-se esterificada na posição 2 dos triacilgliceróis que é menos reativa. Os ácidos graxos poliinsaturados estão, portanto, mais protegidos das reações oxidativas (FREITAS, 2015).

O polissorbato 80 (Tween 80) é uma mistura de moléculas de tamanhos variados, em vez de um único composto uniforme, sua fórmula química é $C_{64}H_{124}O_{26}$. Os polissorbatos contêm 20 unidades de oxietileno, são surfactantes não iônicos hidrofílicos que são amplamente utilizados como agentes emulsificantes na preparação de emulsões estáveis sendo elas óleo em água. Também podem ser utilizados como agentes solubilizantes para uma variedade de substâncias, incluindo extratos vegetais e vitaminas solúveis em óleo, e como agentes molhantes na formulação de suspensões orais e parentéricas. Verificou-se que eles são úteis na melhoria da biodisponibilidade oral de moléculas de medicamentos. Os polissorbatos também são amplamente utilizados em cosméticos e produtos alimentícios. Os mesmos têm um odor característico e um sabor um pouco amargo. Apresenta cor amarelada e formas físicas líquidas, porém pode variar de lote para lote e de fabricante para fabricante, conforme Figura 5. O mesmo é solúvel em etanol e água. Os polissorbatos são amplamente utilizados em cosméticos, produtos alimentícios e formulações farmacêuticas orais, parentéricas e tópicas, e são geralmente considerados materiais não tóxicos e não irritantes (ZHANG, 2009).

Figura 5 – Principais excipientes utilizados no desenvolvimento de emulsões, A – Monoestearato de sorbitano, B – Óleo de milho e C – Polissorbatos



Fonte: Autoria própria (2019).

A água é amplamente utilizada como matéria-prima, ingrediente e solvente no processamento, formulação e fabricação de produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentares e agrícolas. Ela é classificada como potável, purificada, estéril e para injeção. A composição química é variável, a natureza e as concentrações das impurezas contidas nela dependem da

fonte de onde são extraídas. Para a maioria das utilizações a água é purificada por destilação, tratamento por troca iônica, osmose reversa ou algum outro processo adequado. É um líquido claro, incolor, inodoro e insípido. A base para muitas formas de vida biológica e sua segurança na aplicabilidade são inquestionáveis, desde que atenda a padrões de qualidade quanto à potabilidade e conteúdo microbiano. A água pura é considerada levemente tóxica (DUBASH; SHAH, 2009).

3.7 ESTABILIDADE

O estudo de estabilidade indica o grau relativo às várias condições que possam estar sujeitos desde sua fabricação até ao término do prazo de validade. Este estudo contribui para orientar o material de acondicionamento, os componentes da fórmula, estipular o prazo de validade, aperfeiçoar a formulação e auxiliar no monitoramento da conservação. O produto pode ser afetado por componentes ativos ou não. Estas alterações podem ser causadas por fatores extrínsecos, quando determinadas por fatores externos ou intrínsecos, quando determinadas por fatores inerentes à formulação (ANVISA, 2004).

As análises de estabilidade devem fornecer informações do produto no menor tempo possível. Para isso, as amostras devem ser armazenadas em condições que aceleram as mudanças prováveis de ocorrer durante o prazo de validade. Deve-se atentar a estas condições para que as mesmas sejam extremas, ocorrendo o aceleração do envelhecimento e demonstrando o que não ocorreria no mercado em condições normais (ANVISA, 2004).

Os parâmetros a serem avaliados na estabilidade devem ser definidos pelo formulador, dependendo das características dos componentes da formulação. De modo geral, avalia-se características organolépticas (aspecto, cor e odor), físico-químicas (pH, condutividade elétrica, índice de acidez, DPPH, tamanho de partícula, microscopia e ácidos graxos) e microbiológicas (microrganismos patogênicos específicos e contagem de mesófilos) (ANVISA, 2004).

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária é responsável por regulamentar e fiscalizar a produção e comercialização de produtos, para proporcionar produtos seguros e com garantia de qualidade, assim, proporcionando mais saúde a população (ANVISA, 2019).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EXTRATOS DE *Pterocaulon angustifolium*, *Praxelis sanctopaulsensis* E *Disynaphia filifolia*

As plantas foram coletadas na região dos Campos Gerais do Paraná em março de 2016 e as espécies foram identificadas pela Prof.^a Dr.^a. Marta Regina Barrotto do Carmo, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Ponta Grossa, tendo o número de registro para *Pterocaulon angustifolium* de HUPG: 21698, *Praxelis sanctopaulsensis* de HUPG: 22274 e *Disynaphia filifolia* de HUPG: 22427.

Após a coleta, já na Universidade Estadual de Maringá, as folhas e caules das plantas foram secas a 35 ± 2 °C por 48 horas e trituradas em moinho de facas, sendo armazenado em local seco. O material triturado foi submetido à extração com etanol P.A. com maceração exaustiva, utilizando a proporção de 230 a 400 g de planta para cada litro de solvente.

Em seguida, passou-se para o evaporador rotativo a 35 °C, onde foi removido todo o solvente e obtido o extrato bruto etanólico. O extrato bruto foi dissolvido em metanol/água 1:1 (400 mL, v/v) e submetido à partição com 3 vezes de 100 mL de cada um dos solventes orgânicos: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol.

Para a remoção dos solventes utilizou-se o evaporador rotativo e foram obtidas as seguintes frações de *Pterocaulon angustifolium* (PA-EB – extrato bruto, PA-HEX – hexânica, PA-DCM – diclorometano, PA-AE – acetato de etila, PA-BUT – butanólica e PA-HM – hidrometanólica); de *Praxelis sanctopaulsensis* (PS-EB – extrato bruto, PS-HEX – hexânica, PS-DCM – diclorometano, PS-AE – acetato de etila e PS-HM - hidrometanólica) e de *Disynaphia filifolia* (DF-EB – extrato bruto, DF-HEX – hexânica, DF-DCM – diclorometano, DF-AE – acetato de etila, DF-BUT – butanólica, DF-AQ – aquoso).

Após a extração e fracionamento dos extratos brutos, as amostras foram enviadas à Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) câmpus Toledo, para a realização dos experimentos apresentados a seguir.

4.2 MICRORGANISMOS

As bactérias utilizadas para os ensaios foram *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076); *Shigella flexnerii* (ATCC 12022); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC

15442); *Bacillus subtilis* (ATCC 6633); *Bacillus cereus* (INCQS 00003), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603).

4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A atividade antibacteriana foi definida pelo método de microdiluição em caldo Mueller Hinton (Kasvi). Para o preparo dos extratos, foram pesados 10 mg de cada amostra em microtubos de centrifugação estéreis, e em seguida, adicionou-se 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 950 µL de caldo Mueller Hinton.

As bactérias foram mantidas por meio de repique para caldo Mueller Hinton e incubadas posteriormente a 37 °C por 24 horas (conforme as diretrizes da CLSI (2016), que preconiza a incubação por um período de 20 a 24 horas) em estufa (Ethik modelo 411D), isolando-as pela técnica de esgotamento, onde dos tubos foram semeadas em placas de ágar Mueller Hinton (Kasvi) e incubadas por 24 horas a 37 °C.

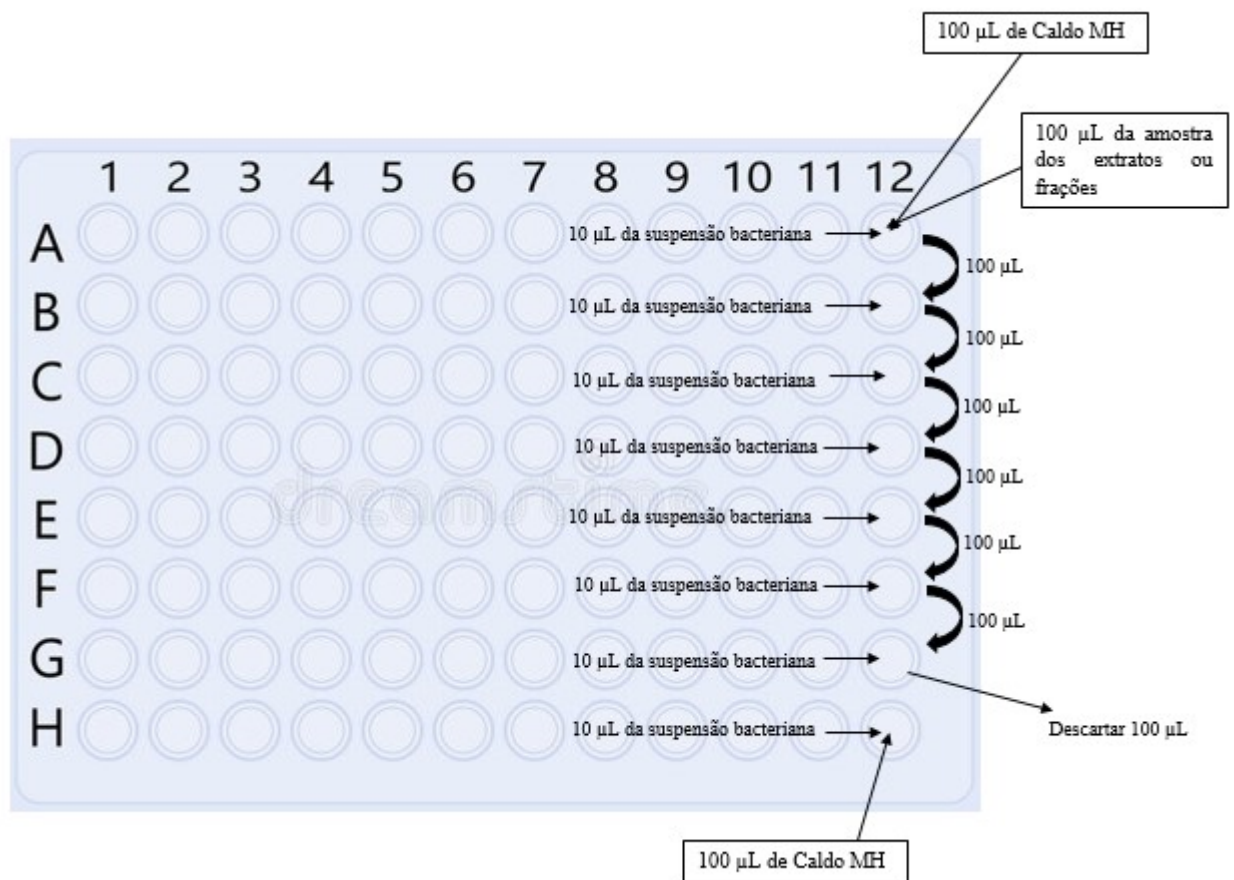
Para os testes, foram utilizadas de três a quatro colônias isoladas e semeou-se em caldo Mueller Hinton e posteriormente incubou-se por 24 horas. As bactérias foram padronizadas em solução salina a 0,85%, comparando a turbidez com um padrão McFarland, de escala 0,5 (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ bactérias mL⁻¹), também estabelecido pela normativa CLSI (2016). Dilui-se a solução microbiana em 1:20 (950 µL do caldo e 50 µL solução microbiana na salina).

A CIM dos microrganismos foi realizada em microplacas de 96 poços de fundo chato (Kasvi). Em todos os poços foram pipetados 100 µL de caldo Mueller Hinton e foram adicionados 100 µL de amostra (extrato bruto ou frações) no primeiro poço, realizando diluição seriada, pipetando 100 µL do poço anterior para o próximo conforme Figura 6. O último poço foi utilizado como controle de crescimento do microrganismo, sem amostra.

Também foi realizado um teste apenas com o solvente utilizado para diluir a amostra (DMSO mais caldo Mueller Hinton) para ver se o mesmo não causaria inibição do crescimento microbiano. Em seguida, incubaram-se as microplacas a 37 °C por 24 horas. Como padrão foi utilizado o antibiótico ampicilina (Sigma-Aldrich), pois o mesmo faz parte do grupo de antibióticos com aplicação em testes de sensibilidade, e foi preparada na concentração de 1 mg mL⁻¹.

Após incubação de 24 horas, foi realizado a leitura das microplacas, observando a presença ou ausência de crescimento bacteriano visível na microplaca. Para isso, observou-se qual o último poço de cada coluna não teve crescimento bacteriano, ou seja, os poços que apresentaram ausência de turvação visível, foram considerados como a concentração inibitória mínima frente à bactéria testada.

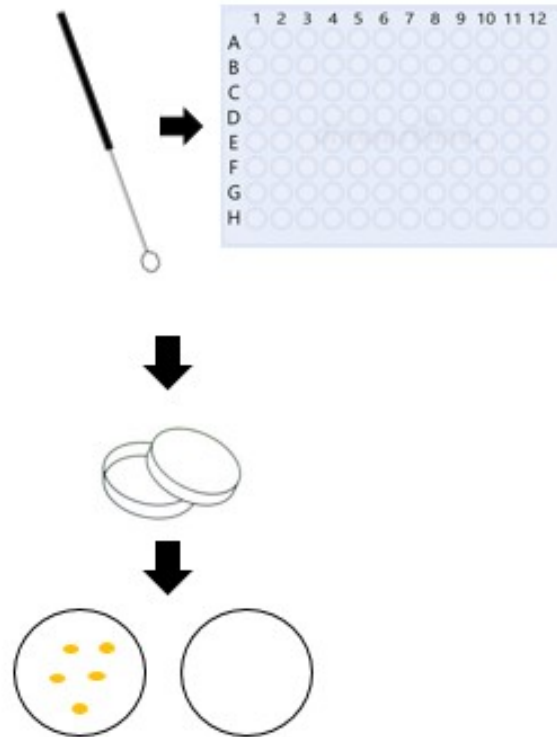
Figura 6 - Microdiluição em placa de 96 poços de fundo chato para verificação na concentração inibitória mínima do extrato bruto e suas frações frente as bactérias *Escherichia coli*; *Salmonella enteritidis*; *Shigella flexnerii*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Bacillus subtilis*; *Bacillus cereus*; *Staphylococcus aureus*; e *Klebsiella pneumoniae*.



Fonte: Autoria própria (2019).

A determinação da Concentração Bactericida Mínima foi realizada a partir dos resultados positivos obtidos na CIM, utilizando placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton. Foi utilizada uma alíquota de cada poço em que não houve crescimento com auxílio de uma alça de platina e semeado em placa de Petri conforme Figura 7. As placas foram mantidas em estufa por 24 horas a 37 °C. A CBM foi considerada a menor concentração sem o crescimento bacteriano visível no ágar.

Figura 7 - Determinação da concentração bactericida mínima do extrato bruto e as frações que apresentaram concentração inibitória mínima para as bactérias *Escherichia coli*; *Salmonella enteritidis*; *Shigella flexnerii*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Bacillus subtilis*; *Bacillus cereus*; *Staphylococcus aureus*; e *Klebsiella pneumoniae*



Fonte: Autoria própria (2019).

Como teste confirmatório da CIM, após semear a alíquota da CBM, inseriu-se o corante 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) 0,5 % (mg mL^{-1} em metanol), onde foi pipetado 5 μL em cada poço que não apresentava crescimento visível, ou seja, não estava turvo. Também, foi pipetado esta solução no primeiro poço que apresentou crescimento microbiano visível e incubado por 3 horas a 37 °C. Após este período, foi realizada a leitura das microplacas, observando a presença ou ausência da coloração rosa. TTC é incolor na forma oxidada e vermelho quando reduzido. Os microrganismos vivos reduzem o TTC por ação enzimática, originando o Formazan que é mantido dentro dos grânulos das células, que se tornam rosas (BELOTI et al., 1999).

4.4 CURVA DE MORTE

O ensaio de curva do tempo de morte microbiano comprovou o tempo em que a substância teste levou para matar a cepa ou verificou seu comportamento na inibição da mesma. O teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita na norma M26-A do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1999) e avaliado a partir da CIM e CIM x 2 da fração

PA-DCM. Adicionalmente, foram feitos o controle de crescimento para as bactérias. Todos os testes foram feitos em duplicata.

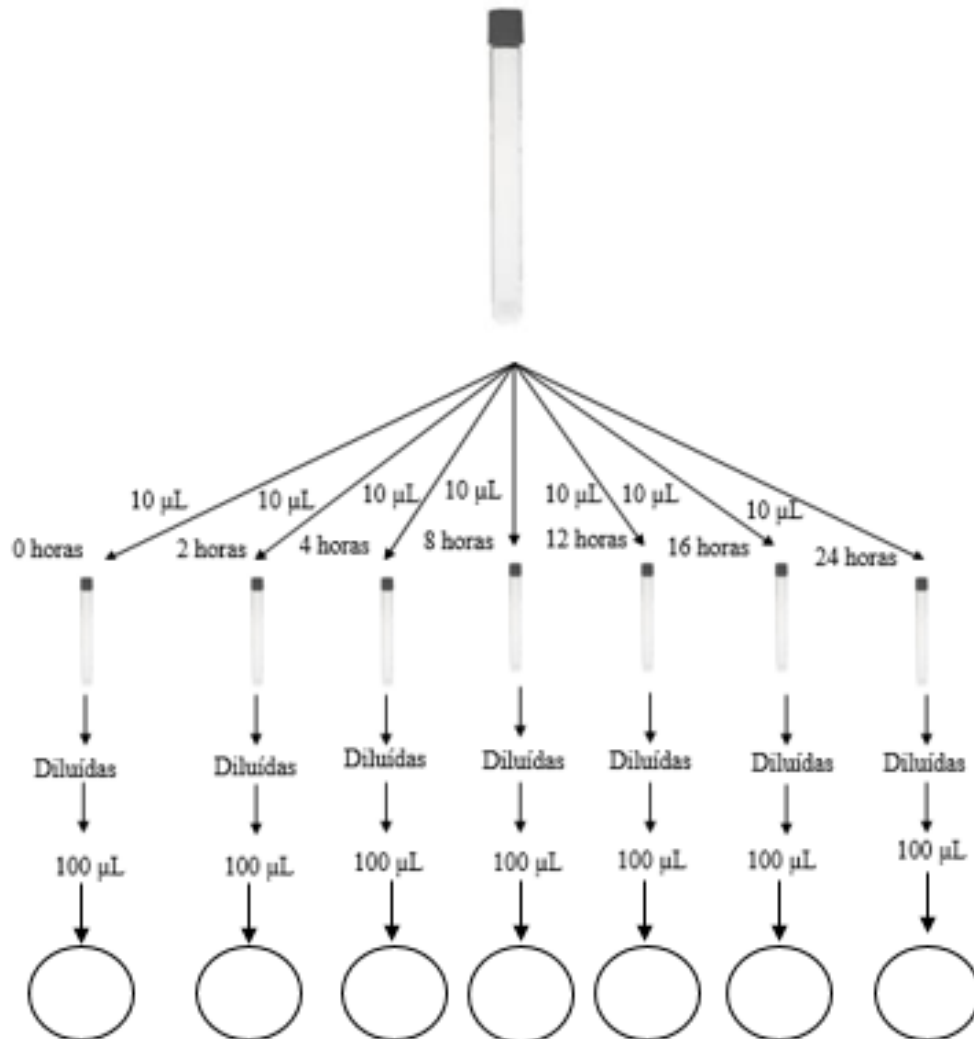
Para os testes, foram utilizadas de três a quatro colônias isoladas onde foram semeadas em caldo Mueller Hinton e posteriormente incubadas por 24 horas. As bactérias foram padronizadas em solução salina a 0,85 %, comparando a turbidez com um padrão McFarland, de escala 0,5 (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ bactérias mL^{-1}). Diluiu-se a solução microbiana em 1:20 (950 μL do caldo e 50 μL solução microbiana na salina).

Em seguida foram preparadas as soluções (1 mL) para realização da curva na CIM e CIM x 2, nas concentrações de 2,5 mg mL^{-1} e 5,0 mg mL^{-1} da fração de PA – DCM para *Shigella flexnerii*, 5,0 mg mL^{-1} e 10,0 mg mL^{-1} para *Pseudomonas aeruginosa*, 1,25 mg mL^{-1} e 2,50 mg mL^{-1} para *Bacillus subtilis*, 2,5 e 5,0 mg mL^{-1} para *Bacillus cereus*, 1,25 mg mL^{-1} e 2,50 mg mL^{-1} para *Staphylococcus aureus* e em cada solução destas foi adicionado 45 μL da suspensão bacteriana padronizada. Após o preparo foi incubado a 37 °C durante 24 horas.

Neste período de 24 horas foram realizadas coletas de 10 μL nos tempos de 0, 2, 4, 8, 12, 16 e 24 horas. Estas alíquotas foram diluídas e desta diluição foi pipetado 100 μL em cada placa de petri com ágar MH e semeadas com alça de drigalski conforme Figura 8. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas na temperatura de 37 °C e seguidamente foi realizado a contagem microbiana.

Para verificar a cinética de morte microbiana foi plotado um gráfico em log de UFC mL^{-1} em função do tempo (horas) e foi analisado se o mesmo apresentava perfil ascendente ou descendente. Também, foi avaliado a atividade bacteriostática ou bactericida da fração na sua CIM e CIM x 2 perante as bactérias *S. flexnerii*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *B. cereus* e *S. aureus*. As concentrações dos extratos que em 24 horas não apresentaram nenhum crescimento microbiano foram denominados de bactericidas e as concentrações dos extratos que neste mesmo tempo apresentavam crescimento na CIM foram denominadas de bacteriostáticas (WALSH, 2003).

Figura 8 - Realização da curva do tempo de morte microbiano da fração PA-DCM em sua CIM e CIM x 2 para as bactérias *Shigella flexnerii*; *Bacillus subtilis*; *Bacillus cereus*; *Staphylococcus aureus*; e *Klebsiella pneumoniae*.



Fonte: Autoria própria (2019).

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - DPPH

Este método envolve a captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Boroski et al. (2015), utilizando o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico – Sigma Aldrich) como antioxidante padrão.

Para preparar o DPPH (Sigma-Aldrich), pesou-se 3,6 mg do reagente em um balão de 100 mL e completou-se o volume com etanol (Neon). A leitura da absorbância da solução etanólica de DPPH foi antes do início dos testes, buscando assegurar o valor abaixo de 1.000.

A solução foi preparada em balão âmbar para não haver sua degradação pela luz. Inicialmente, foi realizada a curva de calibração com padrão Trolox (Sigma-Aldrich), em etanol, com concentração de $2000 \mu\text{mol L}^{-1}$. O mesmo foi preparado no momento da análise. A partir desta solução de padrão Trolox, foram preparadas as diluições com concentração: 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 e $1500 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Os extratos foram pesados em microtubos de centrifuga, sendo 1 mg e solubilizados com 1 mL de etanol, exceto as frações PA-AE, PS-AE, PA-EB e PA-DCM, que apresentaram absorvância acima da curva e tiveram que ser diluídos em etanol na concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Em seguida pipetou-se $50,0 \mu\text{L}$ das amostras em um tubo de centrifugação tipo Falcon de 15 mL protegidos com papel alumínio e $3,0 \text{ mL}$ da solução de DPPH. Os tubos Falcon foram agitados em agitador de tubos tipo Vortex e deixados em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz.

Para o branco foi utilizado $50 \mu\text{L}$ de água para $3,0 \text{ mL}$ de etanol. Após o período de 30 minutos em repouso, realizou-se a leitura das amostras e da curva de calibração nas diferentes concentrações em um espectrofotômetro UV/Vis (Instrulab modelo T80) em 517 nm , onde a solução de DPPH apresentou um máximo de absorção. O experimento foi realizado em triplicata. A atividade antioxidante foi determinada por comparação da absorvância das amostras contra a curva de calibração construída com o padrão Trolox e expressa como μmol de equivalentes Trolox por grama de extrato ou fração.

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - FRAP

Para determinar atividade antioxidante através da redução de ferro (FRAP), de acordo com a metodologia descrita por Boroski et al. (2015), foram inicialmente preparadas todas as soluções necessárias, começando com a solução de tampão acetato de sódio $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,6 e a solução TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) na concentração de 10 mmol L^{-1} . Em seguida, foi realizado o preparo da solução de FeCl_3 (cloreto de ferro III), na concentração de 20 mmol L^{-1} e por último as soluções acima foram utilizadas para o preparo do reagente FRAP ($[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_3$) nas proporções 10:1:1 (v/v/v), onde foi adicionado: 100 mL da solução tampão de acetato de sódio $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,6, 10 mL da solução TPTZ e 10 mL da solução de FeCl_3 . Todas as amostras foram analisadas em triplicata e ao abrigo da luz.

Os extratos foram pesados em microtubos de centrifugação, sendo 1 mg e solubilizados com 1 mL de etanol, exceto as frações PA-EB, PA-AE, PA-DCM e PA-BUT que apresentaram absorvância acima da curva e tiveram que ser diluídos em etanol na concentração de $0,5 \text{ mg}$

mL⁻¹, também as frações DF-AE, DF-BUT, PS-HM, PS-AE, PA-HM e PA-HEX tiveram que ser diluídas novamente pelo mesmo motivo acima, sendo que nestes casos foram diluídos em etanol na concentração de 0,25 mg mL⁻¹ extrato. Foi construída a curva de calibração com padrão Trolox, (Sigma-Aldrich) utilizando a concentração estoque de 2000 µmol L⁻¹ em etanol. Este foi preparado no momento da análise e sob abrigo da luz. A partir desta solução foram preparadas diluições de concentração: 0, 100, 200, 300, 500, 600, 700, 900, 1000 µmol L⁻¹.

A técnica consistiu no seguinte procedimento: adicionou-se em tubo de centrifugação tipo Falcon, 3 mL de reagente FRAP, 100 µL da solução do extrato e 300 µL de água destilada. Homogeneizou-se e incubou-se em banho de água (Centauro modelo 0139) por 40 min a 37 °C. Em seguida, foi realizada sua leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 593 nm. Para a construção da curva padrão realizou-se o mesmo procedimento. A atividade antioxidante foi determinada por comparação da absorbância das amostras com a curva de calibração construída com o padrão Trolox e os resultados expressos como µmol de equivalentes Trolox por grama de extrato ou fração.

4.7 DESENVOLVIMENTO DA EMULSÃO

O preparo da formulação foi realizado segundo Seibert et al. (2019), onde foi realizado pelo método de inversão de fases. Para o mesmo foi utilizado um béquer, onde foram adicionados todos os componentes da fase aquosa (FA) e em outro se misturou todos os componentes da fase oleosa (FO), conforme descrito a Tabela 1.

Tabela 1 - Proporções em porcentagem e excipientes utilizados para o preparo de uma emulsão base.

Fase Oleosa (FO)	% (p/p)
Óleo de milho (Liza)	5,0
Monoestearato de sorbitano (Span 60)	3,0
Polisorbato 80 (Tween 80)	7,0
Fase aquosa (FA)	% (p/p)
Água deionizada	q.s.p. 100 mL

Fonte: Seibert et al. (2019).

As fases aquosa e oleosa foram aquecidas até 75 °C. Após, verteu-se lentamente a fase aquosa na fase oleosa com o auxílio de uma bureta em uma velocidade de escoamento de 1 mL em 21 segundos e em agitação mecânica (agitador mecânico Edutec) de 600 RPM. Após toda

a fase aquosa ser vertida na fase oleosa continuou-se agitando até completo resfriamento (aproximadamente 30 minutos até 25 °C).

Para as análises de estabilidade foram preparadas cinco formulações utilizando a metodologia descrita anteriormente e seguindo a composição descrita na Tabela 2, utilizando como referência também os limites recomendados pelo Handbook (2009).

Tabela 2 - Composição das cinco formulações com suas respectivas concentrações em porcentagem F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidante e antimicrobianos sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com antimicrobianos sintéticos e 0,05% de PA-DCM).

Formulações em % (p/p)						
Fases	Excipientes	F1	F2	F3	F4	F5
FO	Span 60	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
	Óleo de milho	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
	Tween 80	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
	Fração (PA-DCM)	*	0,5	*	0,5	0,05
	BHT	*	*	0,1	0,1	*
	Parabeno	*	*	0,2	*	0,2
FA	Água deionizada	q.s.p 500g	q.s.p. 500g	q.s.p. 500g	q.s.p. 500g	q.s.p. 500g
	Metilparabeno	*	*	0,2	*	0,2
	EDTA	*	*	0,1	0,1	*

Fonte: Autoria própria (2019).

4.8 CARACTERIZAÇÃO DAS EMULSÕES QUANTO AO TIPO (O/A OU A/O)

Foram realizados dois testes para caracterizar a emulsão. O primeiro foi o teste de solubilidade, baseado no fato que a emulsão deverá ser facilmente diluída no líquido que constitui sua fase contínua, onde, colocou-se 10 mL de óleo mineral em um béquer e 10 mL de água deionizada em outro béquer. Adicionou-se uma gota de emulsão em cada um dos béqueres e foi observado o comportamento da emulsão em contato com cada uma das fases.

O segundo foi o teste em papel filtro descrito por Becher (1957), onde colocou-se uma gota de água, uma gota de óleo mineral e uma gota de emulsão em uma membrana de nitrato de celulose. Assim, foi avaliado o tipo de emulsão através de sua molhabilidade na membrana. Se o líquido se alastrou pela fibra do papel rapidamente, deixando apenas uma pequena gota no centro, tal emulsão foi classificada como é tipo óleo em água (o/a) e caso a emulsão não se alastrasse foi considerada do tipo água em óleo (a/o).

4.9 ANÁLISES PRELIMINARES DAS EMULSÕES

A centrifugação é a técnica mais comumente aplicada para acelerar a separação de fases e desestabilizar uma emulsão. Desta forma, as emulsões foram submetidas a uma centrifugação na rotação de 3.000 RPM (centrífuga marca Novatecnica modelo NT800) por 30 minutos. Quando não há separação de fases neste teste as emulsões podem seguir com os testes de estabilidade (ANVISA, 2004).

Também foi realizado o teste de ciclo gelo-desgelo onde as amostras (7 mL) permaneceram nas temperaturas padronizadas pelo período de 12 dias. O primeiro dia corresponde as 24 horas após o preparo das fórmulas. As amostras foram submetidas a 4 ± 2 °C por 24 horas (Refrigerador Electrolux modelo DC35) e posteriormente a 45 ± 2 °C por 24 horas (Estufa BOD marca Tecnal modelo TE-371), completando assim, um ciclo. Análises macroscópicas (aspecto, cor, odor, separação de fase, pH e condutividade) e microscópicas (microscopia óptica) foram realizadas antes do início do teste e no final do sexto ciclo (12 dias) (LIMA et al., 2008).

A análise de aspecto foi realizada observando visualmente as características das amostras, verificando se ocorreu modificações macroscópicas comparando as amostras assim que formulados e após o ciclo de gelo-degelo. O mesmo é descrito como líquido, homogêneo e as amostras foram classificadas em três categorias: normal sem alteração, levemente separada e/ou levemente precipitada e separada e/ou precipitada (LANGE; HEBERLÉ; MILÃO, 2009).

Também se verificou a cor das emulsões e vários são os métodos utilizados para analisar a mesma. O mais usual é o método visual. Assim, comparou-se a cor das amostras no tempo zero com o resultado encontrado após o ciclo de gelo-degelo. As amostras foram classificadas segundo os seguintes critérios: normal sem alteração, levemente modificada, modificada e intensamente modificada (SANTOS, 2007).

Já, para a análise de odor comparou-se o odor da amostra inicial com as amostras submetidas ao gelo-degelo, diretamente através do olfato. As amostras foram classificadas segundo os seguintes critérios: normal sem alteração, levemente modificada, modificada e intensamente modificada (LANGE; HEBERLÉ; MILÃO, 2009).

O pH definiu o potencial hidrogeniônico das emulsões e foi mensurado em temperatura de 25 °C usando potenciômetro digital (Mestecnoyon) previamente calibrado com soluções tampão de pH 4 e 7. As análises foram realizadas em triplicata (ANDRADE et al., 2018).

Para a determinação da condutividade elétrica foi utilizado um condutivímetro (Policontrol modelo MCA-150P). O eletrodo foi inserido diretamente nas amostras e as leituras foram realizadas em triplicata à temperatura de 25 °C (LIMA et al., 2008).

A análise de microscopia óptica foi realizada observando as microestruturas das emulsões em microscópio óptico (Zeiss modelo Axioscope 5). Uma gota de emulsão coletada na parte superior do frasco contendo a amostra foi colocada cuidadosamente sobre a lâmina, coberta com lamínula e observada em ampliação de 40 vezes. As imagens foram registradas com câmera AxioCam modelo 702 mono (ANDRADE et al., 2018).

4.10 ESTABILIDADE

As emulsões foram submetidas ao ensaio de estabilidade, sendo analisados os tempos 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias nas temperaturas de 25 °C e 45 °C, conforme guia de estabilidade 28/2019 da ANVISA. Os testes realizados para verificar a estabilidade foram aspecto, cor, odor, pH, condutividade elétrica, índice de acidez, DPPH, tamanho de partícula, microscopia, análises microbiológicas e ácidos graxos.

A análise de aspecto foi realizada observando visualmente as características das amostras, verificando se ocorreu modificações macroscópicas comparando com o primeiro dia da estabilidade. O mesmo é interpretado conforme item 4.9 (LANGE; HEBERLÉ; MILÃO, 2009).

Para verificação da alteração da cor utilizou-se o método visual. Assim, comparou-se a cor das amostras do primeiro dia de estabilidade com os tempos seguintes. As amostras foram classificadas conforme item 4.9 (SANTOS, 2007).

Para a análise de odor comparou-se o odor da amostra inicial com os dois dias seguintes, diretamente através do olfato. As amostras foram classificadas conforme os critérios do item 4.9 (LANGE; HEBERLÉ; MILÃO, 2009).

O pH definiu o potencial hidrogeniônico das emulsões e foi mensurado em temperatura de 25 °C usando potenciômetro digital (Mestecnoyon) previamente calibrado com soluções tampão de pH 4 e 7. As análises foram realizadas em triplicata (ANDRADE et al., 2018).

Para a determinação da condutividade elétrica foi utilizado um condutivímetro (Policontrol modelo MCA-150P). O eletrodo foi inserido diretamente nas amostras e as leituras foram realizadas em triplicata à temperatura de 25 °C (LIMA et al., 2008).

O índice de acidez foi determinado pelo método de titulometria de neutralização. Foram pesados em um erlenmeyer de 250 mL aproximadamente 2,0 g da amostra e adicionados 25 mL de álcool neutralizado (etanol + éter etílico na proporção 1:2), além de 2 gotas da solução

indicador de fenolftaleína. A mistura foi titulada com solução padronizada de hidróxido de potássio $0,01 \text{ molL}^{-1}$ até o ponto de viragem de incolor para róseo. A solução titulante de NaOH foi padronizada com biftalato de potássio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$), conforme descrito por Tecbio (2007) e Instituto Adolfo Lutz (2004).

Para a análise de antioxidantes, utilizou-se o método que envolve a captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila, o mesmo foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Boroski et al. (2015), conforme já descrito no item 4.5, porém, pesou-se 1,0 g das amostras e solubilizado em 1 mL de etanol para as formulações F1, F3 e F5, e para as formulações F2 e F4 foram necessários pesar 0,5 g das emulsões, porém foi realizado a correção dos resultados após análise.

A medição do tamanho de partícula das emulsões foi conduzida usando o Analisador de Distribuição de Tamanho de Partículas de Espalhamento a Laser (HORIBA LA-960). Este dispositivo pode medir partículas na faixa de 10 nm a 5000 μm . Para o preparo das amostras para as análises foram utilizados 25 μL das emulsões (F1, F2, F3, F4 e F5) e diluídos em 30 mL de água deionizada no momento da leitura.

A análise de microscopia óptica foi realizada observando as microestruturas das emulsões em microscópio óptico (Zeiss modelo Axioscope 5). Uma gota de emulsão coletada na parte superior do frasco contendo a amostra foi colocada cuidadosamente sobre a lâmina, coberta com lamínula e observada em ampliação de 40 vezes. As imagens foram registradas câmera Axiocam modelo 702 mono (ANDRADE et al., 2018).

Por fim, para as análises microbiológicas foram realizados os testes de pesquisa de microrganismos patogênicos específicos e contagem de mesófilos, bolores e leveduras.

No teste de pesquisa de microrganismos específicos colocou-se 1 mL da emulsão em 9 mL de caldo tripticase soja (Merck) e incubou-se o mesmo a 24 horas por $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Após semeou-se 100 μL desta diluição nos meios de cultura: Eosina Azul de Metileno (EMB) (Kasvi), Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) (Merck), Cetrimide (Merck), Baird Parker enriquecido com solução de gema de ovo e telurito (Merck) e Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol (Neogen), para verificação da presença de *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, respectivamente. Para a pesquisa das bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* as placas de petri foram incubadas por 72 horas a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e para *Salmonella enteritidis* e *Candida albicans* as placas de petri foram incubadas por 48 horas a $35 \text{ }^\circ\text{C}$, todas em duplicata. Após este período foi verificado se houve ou não crescimento bacteriano e fúngico, com desenvolvimento de colônias características em cada meio de cultura específico.

Já para contagem de mesófilos semeou-se 100 µL de amostra na superfície do ágar Plate Count Agar (PCA) (Merck) com alça de Drigalski esterilizada e incubou-se por 2 dias a 35°C. Para contagem de bolores e leveduras pipetou-se 100 µL de amostra e semeou-se sobre a superfície do ágar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol (Neogen) com alça de Drigalski esterilizada e incubou-se durante 5 dias por 25 °C. Quando necessário, as amostras foram diluídas previamente à inoculação nos meios de cultura. Os testes foram realizados em triplicata. Após estes períodos foram realizados a contagem de unidades formadoras de colônia (USP 43, 2020).

Para avaliar a composição de ácidos graxos das formulações ao longo do período foi utilizada a metodologia descrita por Hartman e Lago (1973) adaptado por Maia & Rodrigues-Amaya (1993). Para o preparo das amostras, foram pesados 2,0 g da emulsão em um tubo de centrifugação e foram adicionados 5 mL de hexano (Dinâmica). Após, homogeneizou-se durante 1 minuto em agitador vórtex e deixou-se em repouso até separação de fases. Realizou-se a coleta da fase superior (hexânica) que foi evaporada em atmosfera de nitrogênio (N₂). Foram adicionados 4,0 mL da solução metanólica de NaOH 0,5 mol L⁻¹ e aqueceu-se em banho de água a 100 °C. Posteriormente, foram adicionados 5,0 mL da solução esterificante de NH₄Cl : H₂SO₄ : CH₃OH (3:15:500), aqueceu-se em banho de água a 100 °C novamente e procedeu-se a adição de 4 mL de solução saturada de NaCl, agitando-se vigorosamente por 30 segundos. Por fim, foram adicionados 2 mL de n-heptano (marca Dinâmica, grau HPLC) repetindo a agitação por 30 segundos. A fase sobrenadante foi coletada e transferida para um microtubo de centrifugação para injetar no cromatógrafo do momento da análise.

A análise dos ácidos graxos procedeu-se em cromatógrafo gasoso (marca Clarus modelo 680GC), acoplado com detector de ionização de chama (CG-FID) e coluna capilar de sílica fundida Elite-Wax (60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de recobrimento de filme). A coluna foi programada a uma temperatura inicial de 140 °C por 4 °C min⁻¹ até 180 °C por 10 min⁻¹ com uma segunda rampa de 10 °C por min⁻¹ até 240 °C mantida por 12 min. Com fluxo do gás de arraste de 1,20 mL min⁻¹, composto por ar sintético e hidrogênio na proporção de 400:40, volume de injeção de 1 µL e razão de divisão da amostra (Split) de 1:100, temperatura do injetor de 220 °C e detector a 245 °C, as amostras foram analisadas. As áreas dos picos foram determinadas pelo software TotalChrom 6.3.2 e identificados por comparação dos tempos de retenção dos ácidos graxos com mistura de padrões MIX 189-19 (F.A.M.E. Mix, C4-C24 - Sigma).

O tratamento estatístico foi por meio da análise de variância e a comparação das médias pelo teste Tukey (p<0,05) utilizando o programa Action versão 3.7.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Nesta pesquisa, foram utilizadas duas técnicas para quantificar a atividade antimicrobiana dos extratos das plantas contra as bactérias, que são a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM).

Os resultados obtidos para os extratos e suas frações (*Pterocaulon angustifolium* (PA-EB – extrato bruto, PA-HEX – hexânica, PA-DCM – diclorometano, PA-AE – acetato de etila, PA-BUT – butanólica e PA-HM – hidrometanólica); de *Praxelis sanctopaulsensis* (PS-EB – extrato bruto, PS-HEX – hexânica, PS-DCM – diclorometano, PS-AE – acetato de etila e PS-HM - hidrometanólica) e de *Disynaphia filifolia* (DF-EB – extrato bruto, DF-HEX – hexânica, DF-DCM – diclorometano, DF-AE – acetato de etila, DF-BUT – butanólica e DF-AQ – aquoso)) nas técnicas de CIM e CBM estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultado da análise de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CIM) dos extratos e frações das plantas *Pterocaulon angustifolium* (PA-EB – extrato bruto, PA-HEX – hexânica, PA-DCM – diclorometano, PA-AE – acetato de etila, PA-BUT – butanólica e PA-HM – hidrometanólica), *Praxelis sanctopaulensis* (PS-EB – extrato bruto, PS-HEX – hexânica, PS-DCM – diclorometano, PS-AE – acetato de etila e PS-HM - hidrometanólica) e de *Disynaphia filifolia* (DF-EB – extrato bruto, DF-HEX – hexânica, DF-DCM – diclorometano, DF-AE – acetato de etila, DF-BUT – butanólica e DF-AQ – aquoso) em mg mL⁻¹.

Plantas	Extratos e frações	Concentração Inibitória Mínima/Concentração Bactericida							
		BACTÉRIAS							
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Shigella flexnerii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Disynaphia filifolia</i>	DF-EB	*	*	*	5,000/ >5,000	5,000/ 5,000	*	*	*
	DF-HEX	*	*	2,500/ 5,000	5,000/ 5,000	*	*	*	*
	DF-DCM	*	*	5,000/ >5,000	*	*	*	5,000/ >5,000	*
	DF-AE	*	*	*	5,000/ >5,000	*	*	5,000/ >5,000	*
	DF-BUT	*	*	*	*	*	*	*	*
	DF-AQ	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Praxelis sanctopaulensis</i>	PS-EB	*	*	5,000/ >5,000	*	*	*	*	*
	PS-HEX	*	*	*	*	*	*	*	*
	PS-DCM	*	*	*	*	*	*	*	*
	PS-AE	*	*	*	*	*	*	*	*
	PS-HM	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Pterocaulon angustifolium</i>	PA-EB	*	*	2,500/ >5,000	*	5,000/ >5,000	2,500/ >5,000	2,500/ >5,000	*
	PA-HEX	*	*	*	5,000/ >5,000	5,000/ >5,000	*	5,000/ >5,000	*
	PA-DCM	*	*	2,500/ 5,000	5,000/ 5,000	1,250/ 5,000	2,500/ >5,000	1,250/ 5,000	*
	PA-BUT	*	*	*	5,000/ >5,000	*	*	*	*
	PA-AE	*	*	*	*	5,000/ >5,000	*	1,250/ >5,000	*
	PA-HM	*	*	*	*	*	*	*	*
Control e	AMPICILINA	0,031/ 0,125	0,125/ 0,500	0,250/ 0,500	0,016/ 0,062	0,125/ 0,500	0,062/ 0,125	0,016/ 0,062	0,062/ 0,125

* Extratos e frações que não apresentaram CIM/CBM.

Fonte: Autoria própria (2019).

Para a certificação de que as plantas apresentassem potencial de inibição frente às bactérias testadas, foi realizado um controle com o DMSO (dimetilsulfóxido), o qual não inibiu nenhuma bactéria, ou seja, houve crescimento em todos os poços da microplaca em que foi testado o DMSO.

Os resultados da atividade antimicrobiana demonstraram ser adequados ao uso da metodologia empregada para avaliação de CIM e CBM, em que a microdiluição se apresenta como um método eficiente na análise de mais de um composto-teste, assim como a avaliação

em microplacas, de mais de um agente microbiológico em um determinado ensaio (ANVISA, 2014).

Nesse sentido, bacteriostáticos, são produtos com a função de impedir a proliferação dos microrganismos. O bacteriostático impede a multiplicação das bactérias, mas não a mata. Já os bactericidas são substâncias que matam os microrganismos, inibindo enzimas que desempenham um papel fundamental para que a célula bacteriana permaneça viva (SILVA FILHO, 2016).

Observou-se que o extrato bruto e as frações extraídas pelos solventes hexano e acetato de etila da planta *P. angustifolium* apresentaram atividade bacteriostática, isto é, a fração PA-EB inibiu as bactérias *S. flexnerii*, *B. cereus* e *S. aureus* na concentração 2,5 mg mL⁻¹ e *B. subtilis* na concentração de 5,0 mg mL⁻¹. Nessa mesma concentração de 5,0 mg mL⁻¹, a fração PA-AE inibiu a bactéria *B. subtilis* e na concentração de 1,25 mg mL⁻¹ inibiu a bactéria *S. aureus*. A fração PA-BUT inibiu a bactéria *P. aeruginosa* na concentração de 5,0 mg mL⁻¹ e, ainda, a fração PA-HEX apresentou inibição na concentração de 5,0 mg mL⁻¹ das bactérias *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e *S. aureus*.

O extrato que se destacou dos demais foi a fração extraída pelo solvente diclorometano da planta *P. angustifolium* (PA-DCM), pois teve ação bacteriostática para cinco bactérias, sendo elas *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. flexnerii*, nas concentrações 5,0 mg mL⁻¹, 2,5 mg mL⁻¹, 1,25 mg mL⁻¹, 1,25 mg mL⁻¹ e 2,5 mg mL⁻¹, respectivamente. Esse extrato também apresentou atividade bactericida para quatro dessas bactérias, todas na concentração de 5,0 mg mL⁻¹: *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. flexnerii*. Conseqüentemente, o PA-DCM inibiu bactérias de constituição diferenciada em termos de permeabilidade e parede celular bacteriana, as quais apresentam níveis diversos de patogenicidade, sendo gram positivas ou gram negativas, destacando-se das demais frações.

A atividade antimicrobiana contra o maior número de espécies microbianas foi PA-DCM. De fato, essas famílias têm demonstrado atividade antibacteriana contra microrganismos, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *Nocardia gardenen*. Sua atividade poderia justificar o uso popular de algumas espécies de *Pterocaulon* como agente cicatrizante no tratamento de algumas doenças infecciosas e como conservantes alimentares (STEIN et al., 2005), já que os extratos de *Pterocaulon* possuem um amplo espectro de atividade contra um painel de bactérias responsáveis pelas deteriorações em alimentos (ANDRÉ; VALLAEYS; PLANCHON, 2017). Esse extrato é promissor e abre a possibilidade de encontrar novos compostos que conservam alimentos, que sejam eficazes e que forneçam dados positivos quanto ao seu uso.

Sendo assim, conhecer o perfil antimicrobiano dos extratos vegetais é de suma relevância no desenvolvimento de formulações de origem natural, os quais podem apresentar efetiva atuação no combate a doenças bacterianas e como conservantes em alimentos, o que, segundo Amparo et al. (2017), aponta a relação estreita entre o surgimento de novos medicamentos bactericidas e as metodologias de pesquisa biotecnológica.

A planta *P. sanctopaulensis* apresentou atividade bacteriostática apenas para o extrato bruto (PS-EB) para a bactéria *S. flexnerii* na concentração de 5,0 mg mL⁻¹ e não apresentou atividade bactericida na maior concentração testada.

Pôde-se observar que as frações extraídas com os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e extrato bruto da planta *D. filifolia* apresentaram atividade bacteriostática, em que a fração DF-AE inibiu as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus* na concentração 5,0 mg mL⁻¹. Nessa mesma concentração, a fração DF-DCM inibiu as bactérias *S. flexnerii* e *S. aureus*. Já a fração DF-EB apresentou inibição para as bactérias *P. aeruginosa* e *B. subtilis* na concentração de 5,0 mg mL⁻¹, enquanto a fração DF-HEX apresentou inibição na concentração de 2,5 mg mL⁻¹ para a bactéria *S. flexnerii* e 5,0 mg mL⁻¹ para a bactéria *P. aeruginosa*.

Foi verificado que o extrato bruto e a fração hexano da planta *D. filifolia* apresentaram atividade bactericida, sendo que, na concentração de 5,0 mg mL⁻¹, a fração DF-EB se apresentou como bactericida para a bactéria *B. subtilis*, o que também aconteceu com a fração DF-HEX, na mesma concentração, mas para a bactéria *S. flexnerii* e *P. aeruginosa*.

É importante pesquisar compostos naturais com atividade bactericida e bacteriostática devido à resistência bacteriana e a sua utilização como conservante em alimentos, cosméticos, produtos agropecuários, entre outros. A resistência bacteriana está associada a diversos ambientes e pode atingir indivíduos saudáveis. Porém, o uso extensivo e muitas vezes inapropriado dos antibióticos, más condições de higiene, aumento de pacientes imunocomprometidos e a demora no diagnóstico das infecções bacterianas têm favorecido o aumento da resistência a esses compostos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Assim, destacam-se os resultados encontrados para *S. aureus* visto que esta bactéria frequentemente apresenta resistência a meticilina. Esse microrganismo é considerado um dos maiores problemas clínicos e epidemiológicos em infecções hospitalares com resistências aos betalactâmicos, limitando assim as opções terapêuticas (FARIAS, 2008). Com os resultados encontrados para esta bactéria, extratos e frações podem ser candidatos a estudos mais aprofundados para o desenvolvimento fármacos. A deterioração devido a bactérias causa grandes perdas econômicas na indústria de alimentos. Contudo, a esterilização foi considerada por muito tempo um meio amplamente generalizado de conservação de alimentos e bactérias

termofílicas ou termotolerantes foram os agentes comuns na deterioração dos alimentos. Hoje, a demanda do consumidor pela preservação das propriedades organolépticas, nutricionais e de saúde dos alimentos está aumentando. Nesse sentido, a indústria de alimentos tem feito modificações tecnológicas em materiais, processos e ingredientes (ANDRÉ; VALLAEYS; PLANCHON, 2017).

Entre os extratos e as frações envolvidas neste estudo, *P. angustifolium*, *D. filifolia* e *P. sanctopaulensis*, a primeira espécie foi a que melhor apresentou potencial antimicrobiano como conservante alimentar, farmacêutico e cosmético. Por consequência, é importante ressaltar que o resultado apresentado por esse extrato é de extrema importância, principalmente se for levado em consideração o quanto a demanda consumidora por produtos naturais tem aumentado em relação aos produtos industrializados.

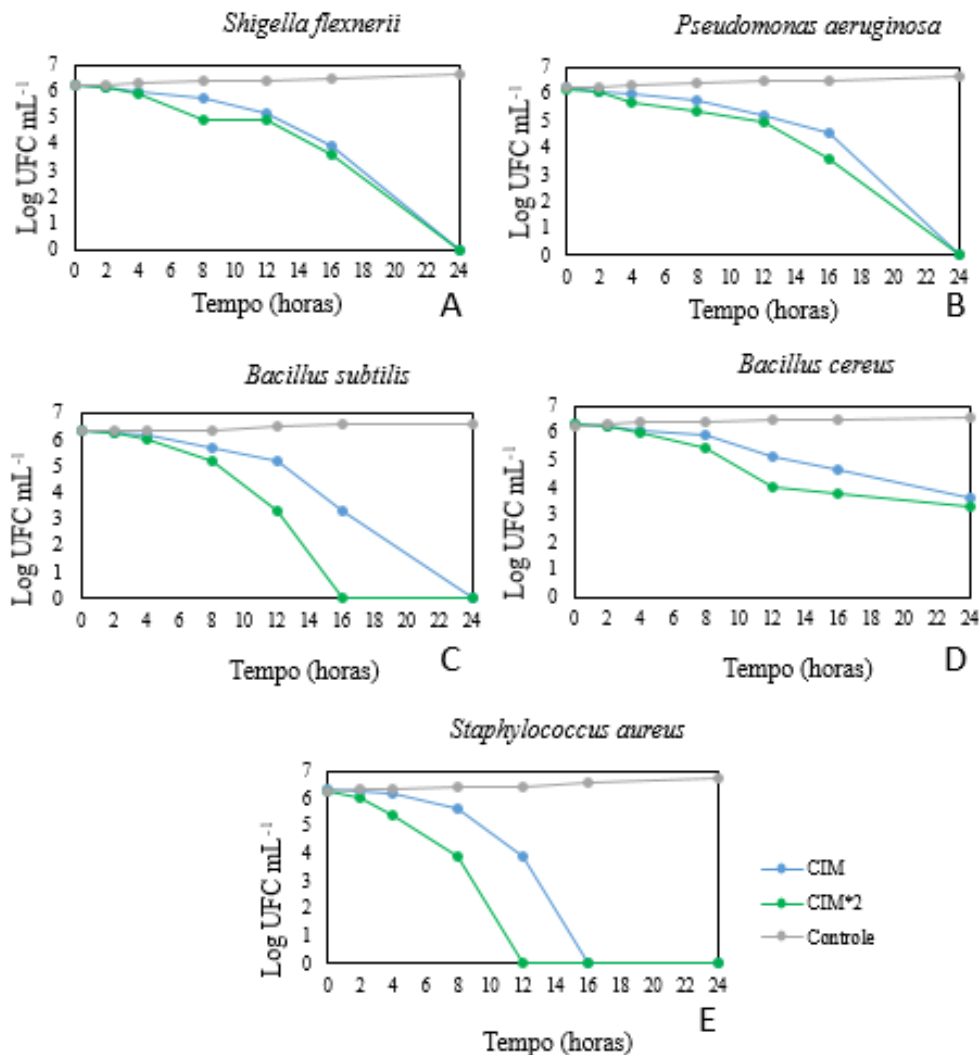
5.2 CURVA DE MORTE

Uma variedade de compostos químicos e sintéticos têm sido usados como antimicrobianos para inibir patógenos em modelos alimentares. No entanto, a preferência por alimentos minimamente processados está aumentando, mas isso deve ser feito sem perda de segurança alimentar e estender a vida de prateleira e melhorar a segurança dos alimentos por microbiota natural ou compostos antimicrobianos. Os extratos naturais têm sido estudados quanto ao seu potencial contra microrganismos patogênicos de acordo com propriedades relatadas, como antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, antitoxigênica e antisséptica. Os compostos naturais com atividade antimicrobiana agem em sítios celulares, causando a perda de constituintes celulares, colapso da membrana citoplasmática bacteriana e subsequente morte celular (ALVES et al., 2016).

Na curva de morte microbiana, é avaliada a evolução de uma população de microrganismos aeróbios num período de tempo específico, testado frente a um agente antimicrobiano. A curva de morte gerada deve mostrar a redução microbiana no intervalo de tempo do uso previsto do produto antimicrobiano (NÓBREGA et al., 2013).

Os resultados da curva de morte microbiana com a concentração inibitória mínima da fração PA-DCM e com duas vezes a concentração inibitória mínima para as bactérias *S. flexnerii*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *B. cereus* e *S. aureus* foram expressas na Figura 9.

Figura 9 - Curva de morte bacteriana com a concentração inibitória mínima (CIM) da fração PA-DCM, com duas vezes a concentração inibitória mínima (CIM x 2) e um controle. A - *Shigella flexnerii* B - *Pseudomonas aeruginosa* C - *Bacillus subtilis* D - *Bacillus cereus* E - *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Autoria própria (2020).

Observa-se que a fração PA-DCM tem efeito bactericida frente à bactéria *S. flexnerii* em ambas as concentrações ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$), podendo ser constatado para ambas uma curva descendente.

Verificou-se, ainda, o resultado da curva de cinética da bactéria *P. aeruginosa* frente à CIM e CIM x 2 de PA-DCM, a qual se revelou descendente desde o tempo zero e apresentou efeito bactericida após 24 horas de exposição em ambas as concentrações ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$).

Além disso, pôde-se observar que a fração PA-DCM confirma os ensaios de CBM e CIM, inibindo a bactéria *B. subtilis*. A fração com duas vezes mais a CIM ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$) apresenta mais rápida inibição, aproximadamente 16 horas, já a CIM ($1,25 \text{ mg mL}^{-1}$) apresenta inibição com aproximadamente 22 horas.

Ademais, a curva de morte da cepa de *B. cereus* frente ao PA-DCM na CIM e CIM x 2 (2,5 e 5,0 mg mL⁻¹) foi descendente, reduzindo 2,7 log na CIM e 3 log na CIM x 2 em 24 horas com relação ao tempo zero. Esse foi o único microrganismo em que não se evidenciou efeito bactericida em nenhuma concentração, somente bacteriostático.

Observa-se que a curva de morte da cepa de *S. aureus* frente à PA-DCM na CIM e com duas vezes a CIM (1,25 e 2,5 mg mL⁻¹) mostrou-se descendente a partir do tempo zero. Esse comportamento se manteve em todos os tempos e apresentou efeito bactericida em 16 horas para CIM e 12 horas para CIM x 2.

O uso de antimicrobianos em alimentos foi relatado para promover a eliminação ou redução de microrganismos e aumentar a vida útil dos alimentos, por exemplo: a *S. aureus* é um patógeno encontrado no leite, cuja doença de origem alimentar resulta da contaminação e ingestão de enterotoxinas pré-formadas produzidas nos alimentos. Assim, laticínios, como leite cru e queijo fresco, podem ser fontes desse patógeno e causar intoxicação humana (ALVES et al., 2016). Como verificado, a fração PA-DCM tem a ação bactericida contra a bactéria *S. aureus*. Conseqüentemente, se esse extrato fosse utilizado em uma formulação alimentar ou cosmética em sua CIM como conservante e o alimento estivesse contaminado com *S. aureus*, provavelmente, em 16 horas, poderia apresentar efeito bactericida contra bactéria.

Dessa forma, as combinações da fração PA-DCM em formulações, mesmo com efeitos bacteriostáticos, podem garantir a preservação dos alimentos e o uso de alguns extratos naturais com efeito antimicrobianos tem se mostrado viável. Estudos como o atual tem mostrado o potencial promissor do uso de formulações combinadas de antimicrobianos naturais contra patógenos alimentares, principalmente no que se refere às análises sensoriais de alimentos e toxicidade decorrente da adição desses compostos (ALVES et al., 2016).

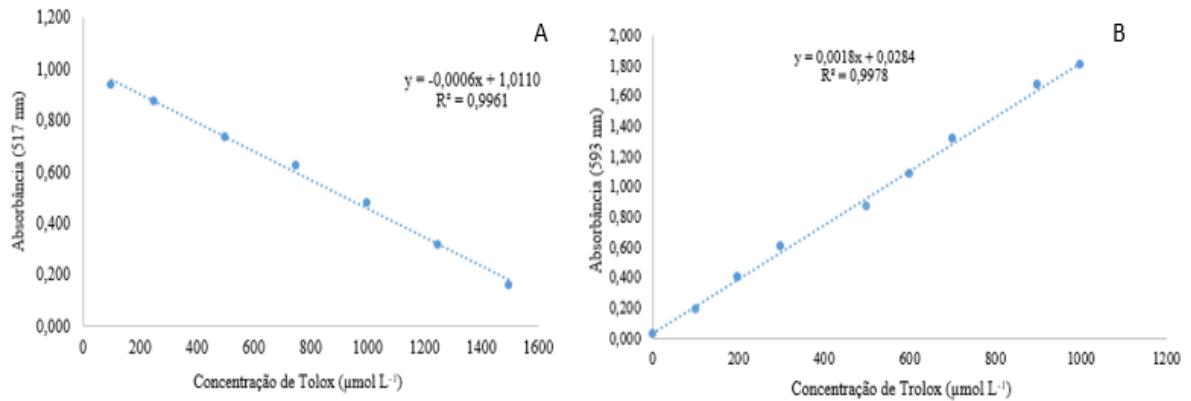
5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Sabe-se que os métodos para determinação da atividade antioxidante possuem diferentes seletividades, em que aminoácidos e peptídeos encontrados na amostra são capazes de reagir e estabilizar diferentes radicais. Também se pode afirmar que os métodos apresentam diferentes reações estequiométricas que ocorrem entre antioxidantes encontrados na amostra e os radicais livres ou íons metálicos, dependendo da natureza dos radicais e de sua solubilidade e difusividade no sistema (LEMES et al., 2019).

Para a verificação da atividade antioxidante dos extratos e frações, inicialmente, gerou-se a curva do padrão Trolox, que apresentou R² de 0,9961 para o método de DPPH e 0,9978

para o método de FRAP (Figura 10). O reagente foi utilizado como controle positivo, pois é um antioxidante padrão conhecido pela inibição de radicais livres.

Figura 10 - Curva padrão Trolox em $\mu\text{mol L}^{-1}$ para os métodos de A - DPPH e B - FRAP.



Fonte: Autoria própria (2019).

Para o método de DPPH, pode ser observado que quanto maior a concentração de Trolox em $\mu\text{mol L}^{-1}$, menor a absorbância em um comprimento de ondas de 517 nm, ou seja, ocorre a inibição do radical DPPH. Já para o método de FRAP (redução do ferro), foi possível verificar que quanto maior a concentração de Trolox em $\mu\text{mol L}^{-1}$, maior a absorbância em um comprimento de ondas de 593 nm.

Sendo assim, os resultados das absorbâncias das amostras obtidos para esses métodos foram aplicados na equação da curva do padrão Trolox e calculados por grama de extrato ou fração. Após, foi realizado o cálculo de correção da diluição dos resultados a fim de comparação entre os mesmos, conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Atividade antioxidante dos extratos ou frações pelos métodos de DPPH e FRAP.

Plantas	Extratos	DPPH ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$)	FRAP ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$)
<i>Disynaphia filifolia</i>	DF-EB	576,54 \pm 2,80	245,84 \pm 5,70
	DF-HEX	353,89 \pm 8,40	87,37 \pm 2,50
	DF-DCM	535,56 \pm 1,00	178,11 \pm 0,60
	DF-AE	991,67 \pm 3,70	680,74 \pm 6,40
	DF-BUT	710,10 \pm 3,20	1465,19 \pm 13,00
	DF-AQ	449,44 \pm 1,90	70,15 \pm 0,60
<i>Praxelis Sanctopaulsensis</i>	PS-EB	722,84 \pm 11,90	520,95 \pm 6,30
	PS-HEX	634,57 \pm 22,20	129,38 \pm 0,60
	PS-DCM	507,78 \pm 5,40	259,96 \pm 1,80
	PS-AE	1424,44 \pm 13,90	1704,30 \pm 11,20
	PS-HM	383,89 \pm 3,50	1010,99 \pm 8,60
<i>Pterocaulon Angustifolium</i>	PA-EB	816,11 \pm 1,00	848,07 \pm 1,70
	PA-HEX	778,21 \pm 5,10	714,42 \pm 14,50
	PA-DCM	1001,11 \pm 8,40	339,56 \pm 2,20
	PA-BUT	776,11 \pm 5,40	369,41 \pm 1,80
	PA-AE	1127,78 \pm 5,10	924,37 \pm 5,60
	PA-HM	551,67 \pm 3,30	1286,06 \pm 8,10

Legenda: *Pterocaulon angustifolium* (PA-EB – extrato bruto, PA-HEX – hexânica, PA-DCM – diclorometano, PA-BUT – butanólica, PA-AE – acetato de etila, PA-HM – hidrometanólica), *Praxelis sanctopaulsensis* (PS-EB – extrato bruto, PS-HEX – hexânica, PS-DCM – diclorometano, PS-AE – acetato de etila, PS-HM - hidrometanólica) e de *Disynaphia filifolia* (DF-EB – extrato bruto, DF-HEX – hexânica, DF-DCM – diclorometano, DF-BUT – butanólica, DF-AE – acetato de etila, DF-AQ – aquoso). Resultados expressos em valores de média \pm desvio padrão.

Fonte: Autoria própria (2020).

Diante do exposto, observa-se que, tanto pelo método de DPPH quanto pelo FRAP, as três plantas apresentaram potencial antioxidante.

Pelo método DPPH, *P. angustifolium* apresentou resultados de 1001,11 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$, 1127,78 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ e 816,111 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ para PA-DCM, PA-AE e PA-EB, respectivamente.

Para a planta *P. sanctopaulsensis*, pelo método DPPH, o que se sobressaiu também foi a fração acetato de etila (PS-AE), obtendo-se o resultado de 1424,44 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$. Ademais, pode-se destacar a fração extraída pelo solvente acetato de etila para a planta *Disynaphia filifolia* (DF-AE), a qual apresentou resultado de 991,667 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$. Entre os solventes utilizados para a obtenção das frações, o que se destacou foi o acetato de etila, pois o mesmo favorece a extração de compostos responsáveis pela captura do radical livre DPPH.

Para a *P. angustifolium*, a fração que apresentou maior atividade pelo método FRAP foi a hidrometanólica (PA-HM) com resultado de 1286,061 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$. Verificou-se que, por esse método, a fração de diclorometano (PA-DCM) apresentou atividade, porém não se sobressaiu às demais, apresentado resultado de 339,556 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$.

Já para a *P. sanctopaulsensis*, pelo método FRAP, a fração de acetato de etila (PS-AE) foi a que se destacou frente às demais frações da planta, expressando o resultado de 1704,296 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$. A fração de acetato de etila da planta *P. sanctopaulsensis* apresenta concordância nos dois métodos, consegue sequestrar o radical DPPH e reduzir ferro. É possível que esta fração apresente tais resultados a partir do ponto em comum, o solvente pelo qual foi obtido.

Conforme relatado, evidencia-se que a fração butanólica, da *D. filifolia* (DF-BUT), foi o que melhor apresentou resultado (1465,185 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$) frente às frações dessa planta para o método FRAP.

Andreo e Jorge (2006) afirmam que a extração dos compostos fenólicos depende da polaridade do solvente empregado. O solvente que se destacou dos demais foi o acetato de etila. Verificou-se que as três plantas extraídas com este solvente apresentaram atividade antioxidante nos dois métodos realizados (DPPH e FRAP).

Segundo Liu et al. (2000), para obtenção de uma eficiente extração de compostos fenólicos de uma matriz vegetal é necessário ser feita a combinação de solventes, como os hidrometanólicos, hidroetanólicos, entre outros e não apenas utilizá-los em sua natureza pura. Esta afirmação pode ser comprovada pelo método FRAP, onde as frações hidrometanólicas das plantas *P. angustifolium* e *P. sanctopaulsensis* apresentaram atividade antioxidante.

As plantas extraídas com os solventes diclorometano e butanol também apresentaram elevada atividade antioxidante, demonstrando assim a importância da realização dos testes de antioxidantes em solventes de diferentes polaridades.

Em relação ao potencial antioxidante, alimentos processados que contêm gorduras e óleos oxidam lentamente durante o armazenamento; vários produtos de oxidação causam ranço e

deterioração das propriedades sensoriais e nutricionais dos produtos alimentares. A auto-oxidação de gorduras e óleo em alimentos processados pode ser evitada pelo uso de inibidores de oxidação ou antioxidantes. Para proteger as células e os sistemas orgânicos do corpo contra espécies reativas de oxigênio, os humanos desenvolveram um sistema de proteção antioxidante altamente sofisticado e complexo que funciona de forma interativa e sinérgica para neutralizar os radicais livres. Dessa forma, os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que eles ataquem as células (PALVAI; MAHALINGU; UROOJ, 2014).

Ao conhecer melhor o perfil antioxidante dos extratos naturais, torna-se possível entender sua aplicabilidade enquanto conservantes de ampla utilização em produtos além de medicamentos. Por exemplo, no âmbito da cosmetologia, conforme relatou Thiesen (2018), os extratos de potencial antioxidante efetivo podem apresentar aplicabilidade, sendo funcionais na conservação dos itens cosméticos; assim como dentro da indústria da alimentação, onde determinados extratos podem ser aplicados em produtos alimentícios (CALEJA et al., 2017; LEÃO et al., 2017).

Por fim, diante do exposto, verificou-se que o extrato bruto e as frações *P. angustifolium* estão entre o maior potencial antioxidante pelo método DPPH frente as demais plantas, além de apresentar elevado potencial de redução observado pelo método FRAP, podendo ser aprimorado o estudo para sua utilização como conservantes em uma formulação alimentar, cosmética, farmacêutica ou agrícola.

5.4 DESENVOLVIMENTO DA EMULSÃO

Após análise dos resultados expostos, escolheu-se a fração PA-DCM oriunda da planta *Pterocaulon angustifolium* para ser aplicada à formulação de emulsão, pois, além de apresentar atividade antimicrobiana, também apresentou atividade antioxidante para o método de DPPH.

Isto foi relevante no desenvolvimento da formulação, uma vez que, conforme afirmou Garcia (2016), na indústria farmacêutica é grande o interesse na descoberta de novos agentes com potencial antimicrobiano e antioxidante a partir de extratos naturais contra diversos microrganismos de ação patogênica.

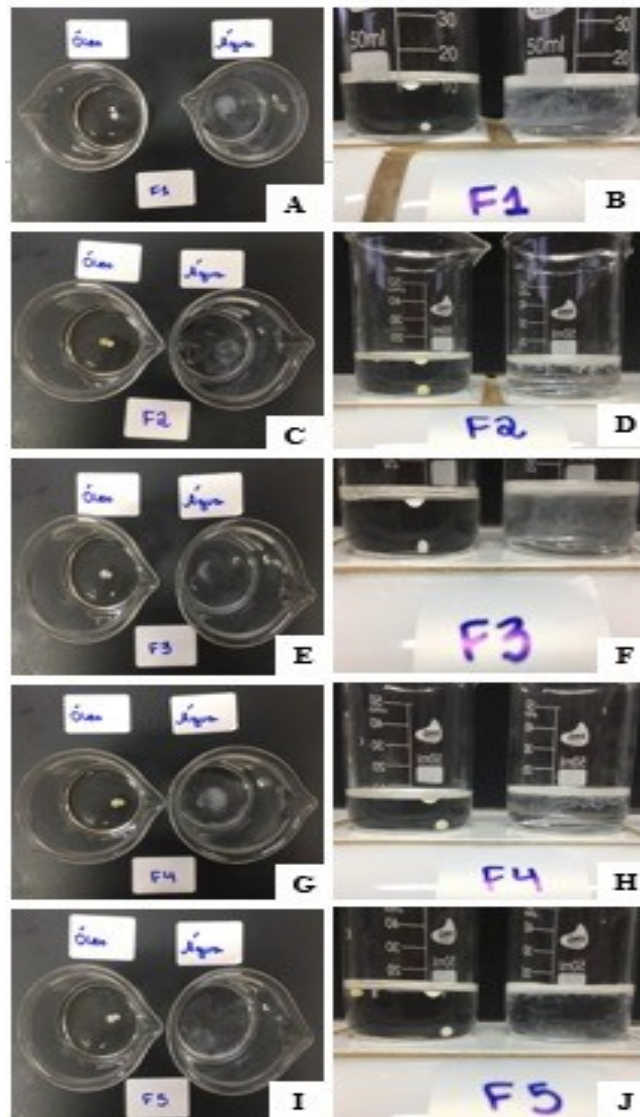
Para tanto, foram elaboradas cinco formulações, sendo elas: F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidante e antimicrobianos sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com antimicrobianos sintéticos e 0,05% de PA-DCM). Após o preparo das formulações de emulsão, foram realizadas as análises de caracterização de emulsão, estabilidade preliminar e estabilidade acelerada.

5.4.1 Caracterização das emulsões quanto ao tipo (O/A ou A/O)

Foram realizados dois testes qualitativos para avaliar se as cinco formulações se tratavam de emulsões óleo em água ou água em óleo.

A primeira análise realizada foi o teste de solubilidade, para verificar se a emulsão era solúvel em óleo ou em água. Os resultados obtidos estão expressos na Figura 11.

Figura 11 - Resultado do teste de solubilidade das emulsões. No béquer da esquerda de cada figura temos uma gota de emulsão em óleo mineral. No béquer direita de cada figuras temos uma gota de emulsão em água deionizada. A – Formulação F1 (controle), B – Formulação F1 (controle), C – Formulação F2 (com 0,5% de PA-DCM), D – Formulação F2 (com 0,5% de PA-DCM), E – Formulação F3 (com antioxidante e antimicrobiano sintéticos), F – Formulação F3 (com antioxidante e antimicrobiano sintéticos), G – Formulação F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos), H - Formulação F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos), I – Formulação F5 (com antimicrobiano sintéticos e 0,05% de PA-DCM), J - Formulação F5 (com antimicrobiano sintéticos e 0,05% de PA-DCM).



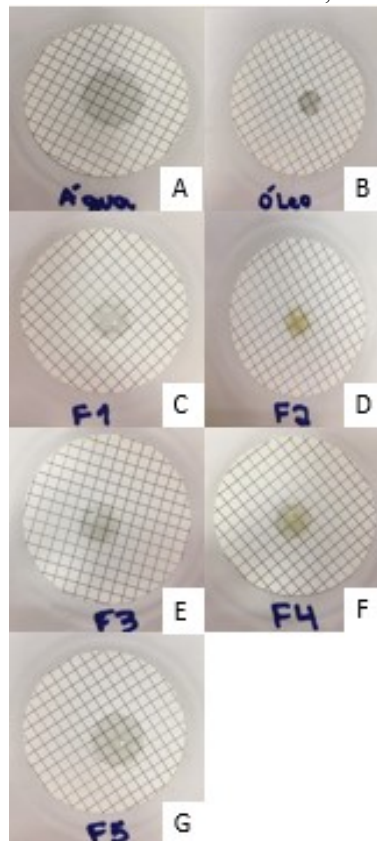
Fonte: Autoria própria (2020).

Com os resultados obtidos nesse teste, pode-se observar que as cinco formulações (F1, F2, F3, F4 e F5) eram solúveis em água e insolúveis em óleo mineral, demonstrando que se tratavam de emulsões óleo em água.

Nguyen, Balsamo e Phan (2013) afirmam que quando a emulsão é óleo em água, a gota de água contendo as gotículas de óleo menores afunda no fundo do frasco de óleo puro. Por outro lado, a gota permanece flutuando no frasco de água pura. Nesse último caso, a gota d'água ocasionalmente quebra liberando as gotas de óleo nela contidas, que podem então ser vistas flutuando na superfície do frasco contendo água, comprovando o resultado obtido.

O segundo teste qualitativo realizado foi o teste de molhabilidade em membrana de nitrato de celulose, no qual foram colocadas uma gota de água deionizada e uma gota de óleo mineral em cada membrana, e observou-se que, enquanto a água deionizada era completamente absorvida pela membrana, o óleo mineral formou uma gota, ou seja, não era completamente absorvida. Então, colocou-se sobre as membranas uma gota de cada uma das emulsões produzidas, conforme Figura 12.

Figura 12 – Resultado do teste de molhabilidade realizado na membrana de nitrato de celulose (F1, F2, F3, F4 e F5), utilizando como padrão água deionizada e óleo mineral. A – Água deionizada, B – Óleo mineral, C – Formulação F1 (controle), D – Formulação F2 (com 0,5% de PA-DCM), E – Formulação F3 (com antioxidante e antimicrobiano sintéticos), F – Formulação F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos), G – Formulação F5 (com antimicrobiano sintéticos e 0,05% de PA-DCM).



Fonte: Autoria própria (2020).

Conforme visualizado na Figura 12, confirma-se que as cinco formulações se referiam a emulsões óleo em água devido ao fato de o líquido se alastrar pela fibra do papel rapidamente, deixando apenas uma pequena gota no centro.

Segundo Andrade et al., (2018) as emulsões são produtos amplamente utilizados na indústria de alimentos, seja como ingrediente em uma formulação ou como produto final. Diversos alimentos são classificados como sistemas emulsionados, como o leite, manteiga, creme de leite e maionese. A maionese, por exemplo, uma emulsão óleo em água, é um dos molhos mais antigos e consumidos mundialmente

Vários estudos demonstraram que os sistemas de emulsão alimentar óleo em água, em que a porção lipídica é dispersa como gotículas minúsculas em uma fase aquosa contínua, podem ser veículos eficazes para a entrega de lipídios bioativos aos alimentos. A suscetibilidade desses lipídios emulsificados à oxidação depende do grau de insaturação dos ácidos graxos, das propriedades físicas das gotículas da emulsão em relação ao ambiente molecular circundante e das interações com outras moléculas (CHEN; MCCLEMENTS; DECKER, 2010).

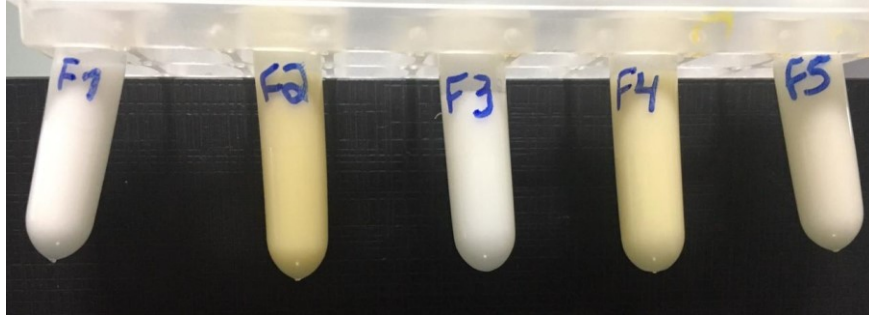
Pode-se, então, verificar que a emulsão ser óleo em água apresenta inúmeros benefícios e a inclusão de um extrato com propriedades antimicrobiana e antioxidante vem a agregar uma maior eficácia na conservação da emulsão.

5.4.2 Análises preliminares das emulsões

As análises da estabilidade preliminar foram realizadas previamente à realização das análises da estabilidade acelerada.

O teste de centrifugação tem por finalidade aumentar abruptamente a força de gravidade, aumentando a movimentação das partículas, e gerar condição favorável para se observar uma possível instabilidade. É considerado um teste de triagem e não deve necessariamente indicar a estabilidade física real das preparações, porém é eficiente para selecionar as emulsões que devem ser submetidas aos testes de estabilidade acelerada (ANVISA, 2004). Sendo assim, foi realizada a centrifugação de todas as formulações previamente para verificar se alguma delas apresentava separação entre as fases antes de submetê-las à estabilidade e o resultado está conforme Figura 13.

Figura 13 – Resultado do teste de centrifugação das emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidante e antimicrobianos sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com antimicrobianos sintéticos e 0,05% de PA-DCM), realizados na estabilidade preliminar.



Fonte: Autoria própria (2020).

Após o teste, nenhuma formulação apresentou qualquer sinal de instabilidade física, tais como a cor, aspecto ou separação de fase. Essa última característica é uma das mais importantes a serem analisadas, pois, uma vez ocorrida a separação de fases, todas as outras características específicas de uma emulsão também serão afetadas (CATALÁ CASTELI et al., 2008). Como no teste de centrifugação as emulsões permaneceram estáveis, foi possível prever que as formulações permaneceriam estáveis por um determinado prazo de validade.

Depois do teste de centrifugação realizado, novas alíquotas das amostras foram submetidas ao ciclo de gelo-degelo, sendo expostas a alternadas temperaturas. Trata-se de um procedimento que leva à avaliação da estabilidade, antecipando os processos de características físicas e organolépticas da formulação passíveis de ocorrerem durante as condições normais de estocagem (FRIEDRICH et al., 2007). Não foram verificadas alterações importantes nas características físicas e organolépticas da formulação. Sendo assim, cabe ressaltar que, antes de iniciar o teste e ao terminá-lo, as amostras foram avaliadas quanto ao seu aspecto, cor, odor, separação de fase, pH, condutividade e microscopia óptica.

Na Figura 14, pode-se observar os resultados dos testes de aspecto e cor no início e no término dos ciclos de gelo-degelo.

Figura 14 - Resultado do teste de aspecto e cor das emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidante e antimicrobianos sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com antimicrobianos sintéticos e 0,05% de PA-DCM), no início e após o ciclo de gelo-degelo. A – Amostras antes de serem submetidas ao ciclo de gelo-degelo, B – Amostras após serem submetidas ao ciclo de gelo-degelo.



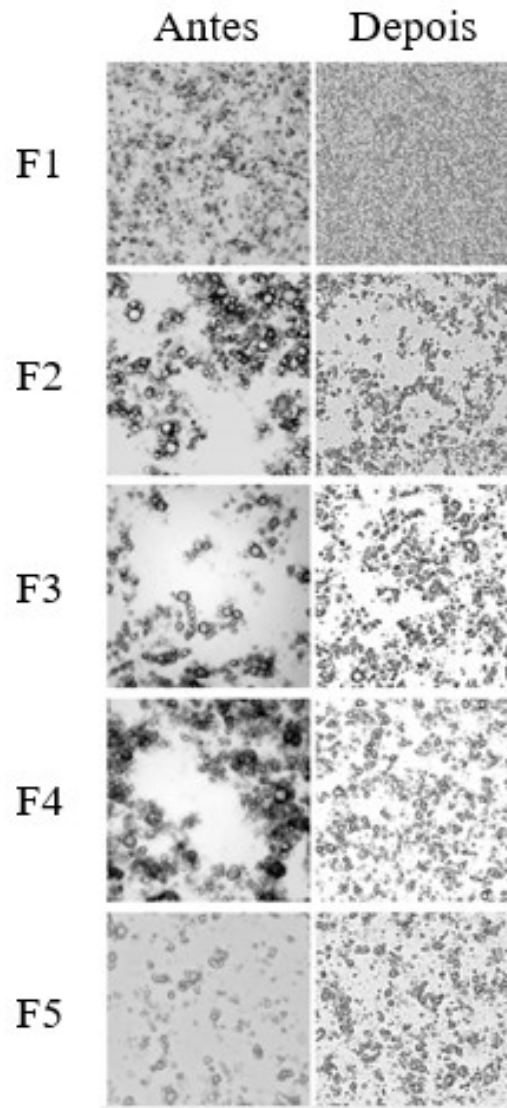
Fonte: Autoria própria (2020).

As emulsões apresentaram mesmo aspecto, cor e odor antes e após o ciclo de gelo-degelo. A formulação F1 (controle) apresentou aspecto líquido e homogêneo, cor branca e sem odor, a F2 (com 0,5% de PA-DCM) apresentou aspecto líquido e homogêneo, cor esverdeada e com odor adocicado, a formulação F3 (com antioxidantes e antimicrobianos sintéticos) apresentou aspecto líquido e homogêneo, cor branca e sem odor, a F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) apresentou aspecto líquido e homogêneo, cor esverdeada e com odor adocicado e F5 (com antimicrobianos sintéticos e 0,05% de PA-DCM) apresentou aspecto líquido e homogêneo, cor branca e com odor levemente adocicado.

Mudança na cor, no aspecto e no odor pode ser atribuída a diferentes fatores que contribuem para a estabilidade das emulsões. Se as emulsões fossem instáveis poderiam produzir substâncias capazes de alterar a cor, aspecto e odor das formulações durante o tempo de armazenamento (KHAN et al., 2013).

Os resultados para microscopia óptica estão apresentadas na Figura 15.

Figura 15 - Microscopia óptica das amostras antes e após exposição ao ciclo gelo-desgelo. Ampliação na objetiva de 40X.



Fonte: Autoria própria (2020).

Pela técnica de microscopia óptica, verificou-se que o tamanho visual das partículas, assim como a dispersão antes e depois do teste, são semelhantes para as cinco formulações. Diante do resultado, as formulações podem permanecer estáveis por períodos de tempos consideráveis, sem problemas com a estabilidade física.

Para verificação da estabilidade preliminar, também foram verificados os resultados de pH e condutividade. A determinação do pH é um parâmetro analítico muito importante, uma vez que alterações no pH podem levar a modificações nas características dos componentes da formulação, inclusive alterações físico-químicas do princípio ativo, levando a instabilidades e comprometimento na qualidade do produto no que diz respeito à sua segurança e eficácia (LIBÓRIO, 2016).

Já a determinação da condutividade elétrica das formulações é uma técnica muito utilizada para monitorar a estabilidade das emulsões, verificando a integridade da fase externa, visto que é dependente da natureza da fase externa da formulação. Através desse método, é possível avaliar a variação no conteúdo de água livre do sistema emulsionado e, dessa maneira, identificar mudanças estruturais que possam ocorrer (MORAIS, 2006).

Os resultados de pH e condutividade estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados referentes ao pH e condutividade das emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidante e antimicrobianos sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com antimicrobianos sintéticos e 0,05% de PA-DCM) submetidas a estabilidade preliminar a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas (Geladeira) e $45 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas (Estufa), após os 6 ciclos (12 dias).

	pH		Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	
	24 horas	Após 6 ciclos	24 horas	Após 6 ciclos
F1	$6,9 \pm 0,1^a$	$6,9 \pm 0,0^a$	$191,1 \pm 0,2^a$	$191,0 \pm 0,1^a$
F2	$6,6 \pm 0,0^a$	$6,6 \pm 0,1^a$	$222,5 \pm 0,1^a$	$222,4 \pm 0,2^a$
F3	$5,9 \pm 0,0^a$	$5,9 \pm 0,2^a$	$356,3 \pm 0,1^a$	$356,1 \pm 0,2^a$
F4	$6,3 \pm 0,0^a$	$6,3 \pm 0,2^a$	$224,9 \pm 0,1^a$	$224,4 \pm 0,2^a$
F5	$6,4 \pm 0,2^a$	$6,4 \pm 0,0^a$	$222,6 \pm 0,2^a$	$222,3 \pm 0,2^a$

Médias \pm desvio padrão seguidas de letras sobrescritas iguais minúsculas (em uma mesma linha) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2020).

Em relação ao pH, as emulsões apresentaram os mesmos resultados antes e após o ciclo de gelo-degelo. Ressalta-se que a redução de pH não é vantajosa, pois ela está relacionada à desestabilização das emulsões e facilita a oxidação lipídica (ANDRADE et al., 2018).

Os resultados desta pesquisa estão de acordo com o que é descrito por Dai, Hinrichs e Weiss (2020), que consideraram as emulsões que tiveram pH entre 2 e 9 foram mais estáveis contra separação gravitacional após armazenamento, ou seja, dificilmente ocorrerá sedimentação. Lawal (2004) relatou o aumento da repulsão eletrostática, maior solubilidade e desdobramento de moléculas de proteínas em valores extremos de pH, como pH 2 e pH 10.

Conforme demonstrado, constata-se que as formulações tendem a manter-se estáveis em pH e podem ser submetidas a uma estabilidade acelerada para comprovação.

Já, em relação à condutividade elétrica antes e após o ciclo de gelo-degelo, houve uma leve diminuição após o teste, sendo de $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ para F1 e F2; $0,2 \mu\text{S cm}^{-1}$ para F3; $0,4 \mu\text{S cm}^{-1}$ para F4 e $0,3 \mu\text{S cm}^{-1}$ para F5. Porém, essa diminuição é insignificante entre as emulsões, ou seja, não houve variação significativa, mostrando previamente a estabilidade das emulsões.

Segundo Lević et al. (2015), a condutividade de todas as amostras líquidas é medida a fim de examinar os efeitos da formação de partículas, verificando se as essas permanecem estáveis por um determinado tempo. Na literatura, é conhecido que, aumentando a

condutividade da solução, é possível diminuir drasticamente o tamanho das partículas produzidas.

Kaci et al. (2014) descreve que, quando a interface óleo em água aumenta, os íons hidróxido são colocados nas interfaces recém-formadas, induzindo a diminuição do hidróxido na solução e, portanto, uma diminuição na condutividade durante o processo de emulsificação. A seguir à formação da camada de hidróxido, uma força atrativa é exercida sobre os íons da solução de Na^+ , causando sua atração para a camada de hidróxido e, assim, a formação de uma camada de contra-íons acima da camada de hidróxido de íon. Nesse sentido, a formação da camada de íons duplos em torno de cada partícula explica a diminuição da condutividade.

Assim, observou-se que as formulações permaneceram estáveis no teste de condutividade após a submissão do ciclo de gelo-degelo, o que demonstra que as emulsões podem ser submetidas aos testes de estabilidade acelerada.

5.5 ESTABILIDADE ACELERADA DAS EMULSÕES

Não somente do ponto de vista comercial, mas também no tocante ao desenvolvimento da formulação, é importante obter resultados rápidos sobre a estabilidade e prazo de validade do produto. Por essas razões, o estudo de estabilidade acelerada é fundamentado em técnicas que aceleram a instabilidade, como a exposição da formulação a diferentes temperaturas (LIMA et al., 2008). Para a presente pesquisa, as emulsões foram expostas em temperaturas a 25 °C e 45 °C, sendo analisadas nos tempos de 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias. As análises realizadas para verificar a estabilidade acelerada foram aspecto, cor, odor, pH, condutividade elétrica, índice de acidez, DPPH, tamanho de partícula, microscopia óptica, análises microbiológicas e ácidos graxos, conforme demonstrado a seguir.

5.5.1 Aspecto cor e odor

Diversos fatores que contribuem para a estabilidade das emulsões podem sofrer variações de acordo com mudanças na cor, no aspecto e no odor. Como os extratos vegetais contêm componentes antibacterianos e antioxidantes que protegem os componentes da emulsão do crescimento microbiano e da oxidação, podem produzir substâncias capazes de alterar a cor da formulação durante o tempo de armazenamento. Além disso, as emulsões contendo água devem

ser preservadas da contaminação microbiana para não apresentar alterações (KHAN et al., 2013).

Na Figura 16, pode-se observar o resultado do teste de aspecto e cor entre as emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de extrato), F3 (com antioxidante e antimicrobiano sintéticos), F4 (com 0,5% de extrato e com antioxidantes sintéticos), F5 (com antimicrobiano sintéticos e 0,05% de extrato) após o período de 28 dias sob a temperatura mais extrema (45 °C).

Figura 16 – Resultado do teste de aspecto e cor das emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidante e antimicrobiano sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos), F5 (com antimicrobiano sintéticos e 0,05% de PA-DCM) expostas a estabilidade acelerada de 45°C.



Fonte: Aatoria própria (2020).

Em temperatura de 25 °C e 45 °C ao longo do período de estudo de 28 dias, a formulação F1 (controle) apresentou aspecto líquido e homogêneo, cor branca e sem odor; a F2 (com 0,5% de PA-DCM) apresentou aspecto líquido e homogêneo, cor esverdeada e com odor adocicado; a F3 (com antioxidantes e antimicrobianos sintéticos) apresentou aspecto líquido e homogêneo, cor branca e sem odor; a F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) apresentou aspecto líquido e homogêneo, cor esverdeada e com odor adocicado e F5 (com antimicrobianos sintéticos e 0,05% de PA-DCM) apresentou aspecto líquido e homogêneo, cor branca e com odor levemente adocicado.

Segundo Khan et al., (2013) se as emulsões fossem instáveis, poderiam produzir substâncias capazes de alterar a cor, aspecto e odor das formulações durante o tempo de armazenamento. Porém, não houve essa alteração e isso demonstra que as emulsões são estáveis em diferentes condições de armazenamento, ou seja, 25 °C e 45 °C ao longo do período de 28 dias, pois não foram observadas diferenças nas propriedades organolépticas entre as emulsões.

5.5.2 pH, condutividade, índice de acidez, DPPH, tamanho de partícula, microscopia óptica e análises microbiológicas.

Nas Tabelas 6 e 7, foram expostos os resultados referentes ao pH, condutividade, índice de acidez, DPPH e tamanho de partícula das formulações F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidantes e antimicrobianos sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com antimicrobianos sintéticos e 0,05% de PA-DCM), expostas a 25 °C e 45 °C por 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias.

Tabela 6 - Resultados da estabilidade acelerada, referentes ao pH, condutividade, índice de acidez, DPPH e tamanho de partícula das emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidantes e antimicrobianos sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com antimicrobianos sintéticos e 0,05% de PA-DCM) submetidas a 25 °C por 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias.

Temperatura 25 °C						
Fórmula	Tempo (dias)	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Índice de acidez (mg KOH g^{-1})	DPPH ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$ de emulsão)	Tamanho de partícula (μm)
F1	1	6,9 ± 0,1 ^a	191,1 ± 0,2 ^a	0,9 ± 0,1 ^a	180,7 ± 6,0 ^a	2,9
	7	6,9 ± 0,1 ^a	191,7 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,0 ^a	175,3 ± 7,7 ^a	1,9
	14	6,8 ± 0,1 ^a	191,5 ± 0,2 ^a	1,0 ± 0,0 ^a	178,3 ± 21,7 ^a	6,6
	21	6,9 ± 0,0 ^a	191,4 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,0 ^a	177,1 ± 1,0 ^a	3,1
	28	6,8 ± 0,1 ^a	191,8 ± 0,0 ^a	1,0 ± 0,1 ^a	175,0 ± 1,7 ^a	10,6
F2	1	6,6 ± 0,0 ^a	222,5 ± 0,1 ^a	1,7 ± 0,2 ^a	5482,6 ± 55,6 ^a	4,8
	7	6,7 ± 0,1 ^a	222,8 ± 0,0 ^a	2,2 ± 0,0 ^a	5467,6 ± 20,4 ^a	4,3
	14	6,4 ± 0,0 ^a	222,8 ± 0,1 ^a	1,9 ± 0,2 ^a	5443,6 ± 23,3 ^a	6,9
	21	6,5 ± 0,1 ^a	222,7 ± 0,1 ^a	2,2 ± 0,1 ^a	5435,4 ± 15,3 ^a	5,9
	28	6,6 ± 0,1 ^a	222,8 ± 0,0 ^a	2,3 ± 0,0 ^a	5446,7 ± 26,7 ^a	7,2
F3	1	5,9 ± 0,0 ^a	356,3 ± 0,1 ^a	2,4 ± 0,0 ^a	416,8 ± 4,2 ^a	5,1
	7	6,1 ± 0,1 ^a	356,1 ± 0,1 ^a	2,9 ± 0,1 ^a	434,2 ± 1,9 ^a	4,6
	14	5,8 ± 0,1 ^a	356,4 ± 0,0 ^a	1,2 ± 0,0 ^a	427,4 ± 6,1 ^a	6,5
	21	5,9 ± 0,0 ^a	356,2 ± 0,2 ^a	2,7 ± 0,1 ^a	420,4 ± 1,0 ^a	6,0
	28	6,0 ± 0,1 ^a	356,3 ± 0,1 ^a	2,7 ± 0,1 ^a	427,8 ± 6,3 ^a	5,4
F4	1	6,3 ± 0,0 ^a	224,9 ± 0,1 ^a	2,5 ± 0,0 ^a	5448,6 ± 7,5 ^a	3,1
	7	6,4 ± 0,0 ^a	224,7 ± 0,0 ^a	3,2 ± 0,1 ^a	5437,8 ± 31,5 ^a	2,5
	14	6,0 ± 0,1 ^a	224,8 ± 0,2 ^a	3,4 ± 0,0 ^a	5448,9 ± 10,2 ^a	3,3
	21	6,0 ± 0,0 ^a	224,9 ± 0,0 ^a	3,4 ± 0,0 ^a	5448,7 ± 12,3 ^a	3,8
	28	6,2 ± 0,1 ^a	224,7 ± 0,1 ^a	3,4 ± 0,1 ^a	5448,9 ± 10,2 ^a	2,9
F5	1	6,4 ± 0,1 ^a	222,6 ± 0,1 ^a	2,4 ± 0,0 ^a	367,8 ± 7,3 ^a	4,3
	7	6,4 ± 0,0 ^a	222,4 ± 0,1 ^a	2,7 ± 0,0 ^a	373,7 ± 13,2 ^a	4,1
	14	6,5 ± 0,1 ^a	222,5 ± 0,0 ^a	2,4 ± 0,1 ^a	364,8 ± 6,4 ^a	5,9
	21	6,5 ± 0,0 ^a	222,4 ± 0,0 ^a	2,4 ± 0,0 ^a	367,2 ± 0,9 ^a	5,3
	28	6,4 ± 0,1 ^a	222,3 ± 0,1 ^a	3,0 ± 0,2 ^a	373,1 ± 4,1 ^a	4,8

Médias ± desvio padrão seguidas de letras sobresscritas iguais minúsculas (em uma mesma coluna) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2020).

Tabela 7 - Resultados da estabilidade acelerada, referentes ao pH, condutividade, índice de acidez, DPPH e tamanho de partícula das emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidantes e antimicrobianos sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com antimicrobianos sintéticos e 0,05% de PA-DCM) submetidas a 45 °C por 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias.

Fórmula	Tempo (dias)	Temperatura 45 °C				
		pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Índice de acidez (mg KOH g^{-1})	DPPH ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$ de emulsão)	Tamanho de partícula (μm)
F1	1	6,9 ± 0,1 ^a	191,1 ± 0,2 ^a	0,9 ± 0,1 ^a	180,7 ± 6,0 ^a	2,9
	7	6,8 ± 0,1 ^a	191,3 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,0 ^a	175,6 ± 0,6 ^a	1,7
	14	6,8 ± 0,1 ^a	191,2 ± 0,0 ^a	1,5 ± 0,0 ^a	167,8 ± 1,0 ^a	2,4
	21	6,8 ± 0,1 ^a	191,4 ± 0,0 ^a	1,9 ± 0,1 ^a	179,0 ± 2,8 ^a	2,3
	28	6,9 ± 0,0 ^a	191,5 ± 0,1 ^a	2,5 ± 0,0 ^b	184,6 ± 1,0 ^a	2,2
F2	1	6,6 ± 0,0 ^a	222,5 ± 0,1 ^a	1,7 ± 0,2 ^a	5482,6 ± 55,6 ^a	4,8
	7	6,6 ± 0,0 ^a	222,5 ± 0,0 ^a	1,9 ± 0,0 ^a	5461,6 ± 16,5 ^a	2,4
	14	6,3 ± 0,3 ^a	222,6 ± 0,1 ^a	1,9 ± 0,1 ^a	5494,3 ± 3,9 ^a	3,9
	21	6,6 ± 0,0 ^a	222,4 ± 0,0 ^a	1,9 ± 0,1 ^a	5460,2 ± 0,0 ^a	3,2
	28	6,6 ± 0,2 ^a	222,7 ± 0,1 ^a	2,2 ± 0,0 ^a	5478,5 ± 25,8 ^a	3,3
F3	1	5,9 ± 0,0 ^a	356,3 ± 0,1 ^a	2,4 ± 0,0 ^a	416,8 ± 4,2 ^a	5,1
	7	6,1 ± 0,0 ^a	356,7 ± 0,0 ^a	2,9 ± 0,0 ^a	413,6 ± 1,9 ^a	2,8
	14	5,7 ± 0,1 ^a	356,3 ± 0,1 ^a	2,7 ± 0,1 ^a	416,7 ± 18,8 ^a	3,9
	21	5,8 ± 0,1 ^a	356,3 ± 0,0 ^a	2,5 ± 0,0 ^a	415,7 ± 0,0 ^a	4,2
	28	5,9 ± 0,2 ^a	356,7 ± 0,0 ^a	2,3 ± 0,2 ^a	413,3 ± 4,4 ^a	3,9
F4	1	6,3 ± 0,0 ^a	224,9 ± 0,1 ^a	2,5 ± 0,0 ^a	5448,6 ± 7,5 ^a	3,1
	7	6,4 ± 0,0 ^a	224,6 ± 0,1 ^a	3,3 ± 0,1 ^a	5423,6 ± 3,8 ^a	2,3
	14	5,9 ± 0,0 ^a	224,5 ± 0,0 ^a	3,5 ± 0,0 ^a	5422,2 ± 3,8 ^a	3,2
	21	6,1 ± 0,1 ^a	224,4 ± 0,0 ^a	3,2 ± 0,0 ^a	5445,9 ± 17,4 ^a	3,1
	28	6,1 ± 0,0 ^a	224,5 ± 0,1 ^a	3,1 ± 0,1 ^a	5425,9 ± 10,6 ^a	2,5
F5	1	6,4 ± 0,2 ^a	222,6 ± 0,2 ^a	2,4 ± 0,0 ^a	367,8 ± 7,3 ^a	4,3
	7	6,5 ± 0,1 ^a	222,9 ± 0,0 ^a	2,4 ± 0,0 ^a	364,0 ± 1,7 ^a	3,6
	14	6,5 ± 0,1 ^a	222,7 ± 0,0 ^a	2,6 ± 0,1 ^a	366,1 ± 2,5 ^a	4,7
	21	6,5 ± 0,0 ^a	222,8 ± 0,1 ^a	2,5 ± 0,0 ^a	362,6 ± 1,6 ^a	4,3
	28	6,5 ± 0,0 ^a	222,6 ± 0,0 ^a	2,5 ± 0,0 ^a	367,8 ± 1,0 ^a	4,2

Médias ± desvio padrão seguidas de letras sobreescritas iguais minúsculas (em uma mesma coluna) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: A autoria própria (2020).

O pH é fundamental para a estabilidade de ativos, principalmente os contidos em bases farmacêuticas (SIQUEIRA, 2016). De forma geral, o pH ideal de uma formulação é

padronizado de acordo com o pH de estabilidade dos componentes ativos utilizados e a tolerância biológica, que para produtos cutâneos varia de 5,5 a 8,0 (AULTON, 2005).

Diante dos resultados de pH, conforme análise estatística ANOVA de fator único, comprovou-se que não há diferença estatística entre as formulações F1, F2, F3, F4 e F5 expostas a 25 °C e 45 °C, no período de 28 dias, uma vez que se obteve valores de p-valor superior a 0,05.

Segundo Siqueira (2016), o pH pode ser ligeiramente alcalino, pois as matérias-primas utilizadas atuam bem dentro desse pH. Já os extremos de pH (abaixo de 3,0 ou acima de 8,0) podem causar ressecamento da pele devido à desestruturação da queratina ou remoção excessiva do sebo. No controle do produto acabado, a avaliação do pH reflete a sua estabilidade, pois é indicativo da reação química em andamento. Ésteres podem sofrer hidrólise, originando ácidos graxos livres e a estabilidade dos ingredientes da formulação, eficácia e segurança do produto podem ser relacionados ao valor de pH. Embora a maioria das emulsões sejam à base de estearatos, o seu pH não deve ultrapassar 7,5, tendo um pH neutro ou ligeiramente ácido, como o pH cutâneo. Esta informação é de grande relevância para a pesquisa realizada visto que os resultados encontrados se apresentaram abaixo deste valor. Com isso as formulações apresentam elevado potencial de estabilidade, não indicando hidrólise.

Normalmente, o pH afeta a estabilidade das emulsões devido a uma alteração das cargas superficiais que afetam as interações eletrostáticas inter ou intraproteínas. Em particular, perto de seus pontos isoelétricos, as cargas são baixas e as emulsões estão sujeitas à desestabilização (DAI; HINRICHS; WEISS, 2020). Porém, esse não foi o caso das formulações desta pesquisa, as quais mantiveram-se estáveis durante o período do estudo.

A condutividade elétrica das emulsões em estabilidade foi determinada em $\mu\text{S cm}^{-1}$ (LIMA et al., 2008). Não existe um padrão de condutividade na legislação, porém, de acordo com Von Sperling (2007), as águas naturais apresentam teores de condutividade na faixa de 10 a 100 $\mu\text{S cm}^{-1}$ e, em ambientes poluídos, os valores podem chegar até 1000 $\mu\text{S cm}^{-1}$.

A condutividade elétrica é um parâmetro muito importante na análise da estabilidade das emulsões, pois alterações nos valores da condutividade nos sistemas dispersos indicam algum tipo de instabilidade física, como, por exemplo, a separação de fases (ANVISA, 2004). Esse parâmetro ainda pode ser utilizado para determinar o tipo de emulsão, pois é dependente da fase contínua ou externa, possibilitando, assim, o monitoramento da integridade da fase contínua durante longos períodos de armazenamento (OLIVEIRA, 2018).

Segundo García et al., (2018) o aumento da condutividade no decorrer do tempo se deve à presença avassaladora de água na fase externa. No mesmo sentido, Kaci et al., (2014)

descrevem que quando a interface óleo em água aumenta, os íons hidróxido são colocados nas interfaces recém-formadas, induzindo a diminuição do hidróxido na solução e, portanto, uma diminuição na condutividade.

Nas formulações desta pesquisa, todas as alterações de aumento e diminuição da condutividade entre os períodos e entre as formulações expostas a 25°C e 45°C são insignificantes estatisticamente. Conforme o teste estatístico não há diferença significativa entre as formulações F1, F2, F3, F4 e F5 em relação à condutividade, visto que os resultados foram maiores que o p-valor (0,05).

Os resultados encontrados na análise de condutividade confirmam os resultados encontrados no teste de separação de fases. A condutividade elétrica confirma a boa estabilidade preliminar, onde não apresentou separação. Variações na condutividade podem indicar perda da estabilidade física da emulsão (separação de fases) e pode indicar também perda da estabilidade química, indicando a geração de ácidos graxos livres provenientes da oxidação lipídica, dos extratos adicionados e de outros componentes da formulação susceptíveis a degradação.

O índice de acidez é um parâmetro que revela a quantidade de ácidos graxos livres (AGL) oriundos do processo de hidrólise dos glicerídeos. Um elevado teor de AGL é indicativo de que o óleo está sofrendo quebra nas cadeias dos gliceróis, liberando seus principais constituintes (VIEIRA et al., 2017).

A acidez livre, por ser consequência da hidrólise parcial dos glicerídeos, não é uma propriedade intrínseca de determinado óleo, mas sim, um parâmetro variável intimamente relacionado com a natureza e qualidade da matéria-prima, com a qualidade e o grau de pureza do óleo e com o procedimento de obtenção e conservação. A acidez de óleos vegetais tende a aumentar no decorrer de seu armazenamento devido à ocorrência de reações de oxidação e hidrólise dos ácidos graxos livres, podendo comprometer o seu aroma, a sua cor e o seu sabor, culminando no processo de rancidez dos mesmos (VIEIRA et al., 2017).

Não houve diferença significativa no índice de acidez das emulsões no período de 28 dias para as formulações F1, F2, F3, F4 e F5 quando expostas a 25 °C e para as formulações F2, F3, F4, e F5 quando expostas a 45 °C, uma vez que se obteve valores de p superiores a 0,05. Porém, foram rejeitadas as hipóteses de igualdade para F1, pois o p-valor foi menor que 0,05, onde se verificou que quando exposta a 45 °C apresentou aumento de 0,9 mg KOH g⁻¹ para 2,5 mg KOH g⁻¹. Essa leve oxidação na formulação F1 pode estar ligada à não utilização de antioxidantes sintéticos ou naturais.

Petenuci, Menegazzo e Fonseca (2018) observaram que a diminuição do índice de acidez ao longo desse tipo de processo indica a eficiência do processo para a redução de ácidos graxos livres e outros compostos indesejáveis. Já conforme Boskovic et al. (2019), o aumento do índice de acidez indica maiores teores de ácidos graxos livres.

Segundo Malinowska, Gliszczyńska-Świgło e Szymusiak (2014), estudos sobre a estabilidade oxidativa de emulsões cosméticas óleo em água são importantes no desenvolvimento da tecnologia de produtos cosméticos. Essas emulsões devem ser testadas em uma ampla faixa de temperatura para garantir que serão estáveis durante o uso geral pelos consumidores, pois poderão armazená-los em diferentes condições.

Para a determinação da atividade antioxidante das formulações, utilizou-se o método DPPH e os resultados foram expressos através da quantidade de antioxidante capaz de sequestrar os radicais livres DPPH presentes nas emulsões.

Conforme análise estatística ANOVA de fator único, observou-se que não há diferença estatística entre as formulações F1, F2, F3, F4 e F5 expostas a 25 °C e 45 °C, no período de 28 dias, uma vez que se obteve valores de p superior a 0,05.

Observou-se, ainda, que as fórmulas com extrato (PA-DCM) (F2 e F4) apresentaram maior atividade antioxidante, comprovando o resultado obtido no teste de DPPH com o extrato isolado. A diferença do resultado na formulação e com o extrato isolado é devido aos demais componentes da formulação (BHT, EDTA e óleo de milho). Isso foi confirmado por Xu et al. (2018), que descrevem que a atividade antioxidante é mais evidente em emulsões do que o extrato na forma isolada.

Ademais, observa-se que as formulações apresentaram coerência entre os resultados de DPPH, onde as formulações com 0,5 % de fração (F2 e F4), demonstraram resultados semelhantes, assim como, a formulação com 0,05 % de fração (F5) exibiu um resultado menor do que as duas formulações com maior concentração. Vale ressaltar que a emulsão F1, denominada como controle apresentou uma pequena atividade antioxidante e pode ser justificada devido à utilização do óleo de milho na formulação. Assim como demonstrado por Ramalho e Jorge (2006), o óleo de milho pode apresentar naturalmente em sua composição componentes antioxidantes como ácido cítrico, vitamina E e betacaroteno.

Na emulsão F3, composta por antioxidantes sintéticos não se evidenciou uma elevada atividade antioxidantes devido à porcentagem utilizada na fórmula não ser alta. Vale salientar que a quantidade de fração do extrato (PA-DCM) utilizada na emulsão F4 (0,5 %) é suficiente para manter a emulsão estável. Menores concentrações de fração (0,05%), demonstrado pela formulação F5, conservam a emulsão com a mesma efetividade. Também, verifica-se que a

fração (PA-DCM) apresenta potencial de atividade antioxidante tal qual a dos antioxidantes sintéticos (BHT e EDTA).

Moure et al., (2007) demonstraram em seu estudo que os antioxidantes preservaram as emulsões da oxidação durante todo o experimento. Resultado encontrado na pesquisa, onde o teste de antioxidante apresentou-se sem diferença significativa.

O tamanho de partículas é uma propriedade muito importante na caracterização das emulsões e que depende tanto da velocidade de agitação do fluido quanto do tipo e quantidade de emulsificante utilizado. A fim de que uma emulsão seja formada, é fundamental algum grau de agitação, uma vez que, para que haja a criação de novas superfícies, é necessário trabalho, por isso, para obter uma emulsão com o tamanho de partícula relativamente pequena, sendo indispensável um maior grau de agitação. Normalmente, quando o tamanho da partícula diminui, há também uma redução na distribuição de tamanho das partículas (AZEVEDO, 2016).

Na pesquisa realizada, constatou-se que não há diferença no tamanho de partícula entre as formulações, assim como não apresenta diferença no período de 28 dias quando expostas a diferentes temperaturas. Além disso, as emulsões apresentaram distribuição monomodal. Segundo Uluata, McClements e Decker (2016), a razão pela qual a emulsão não teve dois picos de tamanho igual é porque as partículas grandes podem se espalhar na luz mais fortemente do que as pequenas e, portanto, dominam o sinal geral de dispersão de luz.

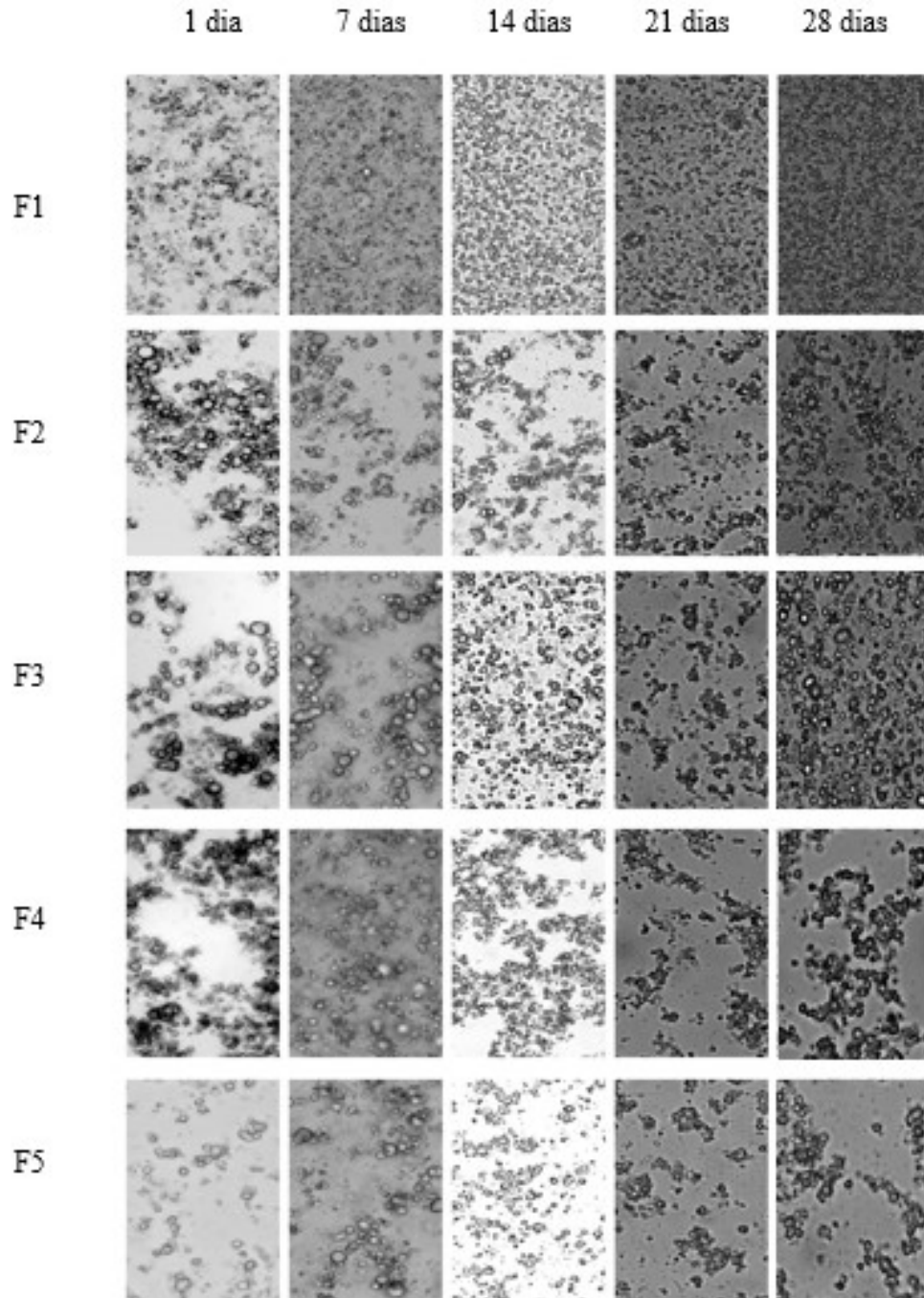
A distribuição do tamanho das partículas afeta muitas características da emulsão, como estabilidade e desempenho do líquido da emulsão. A forma e distribuição de tamanho das partículas presentes na emulsão influenciam as propriedades de fluxo. Partículas maiores fluem mais facilmente do que partículas menores; no entanto, partículas menores dão maior suspensão, viscosidade e estabilidade de emulsão, benefício de ter alta carga de superfície (YOUSUFI et al., 2018), ou seja, emulsões com tamanhos de partículas muito pequenas podem resultar em viscosidades muito altas, enquanto tamanhos de partículas muito grandes podem levar a partículas de emulsão instáveis (MAKAN et al., 2016).

Visto os resultados pode-se verificar que o tamanho das partículas encontrado é de escala micrométrica e isso é benéfico por apresentar alta carga de superfície e conseqüentemente tornar a formulação mais estável.

Diante do exposto, constatou-se que as emulsões são estáveis segundo teste de tamanho de partícula e, para confirmação da estabilidade do tamanho de partícula das formulações foi realizado o teste de microscopia óptica.

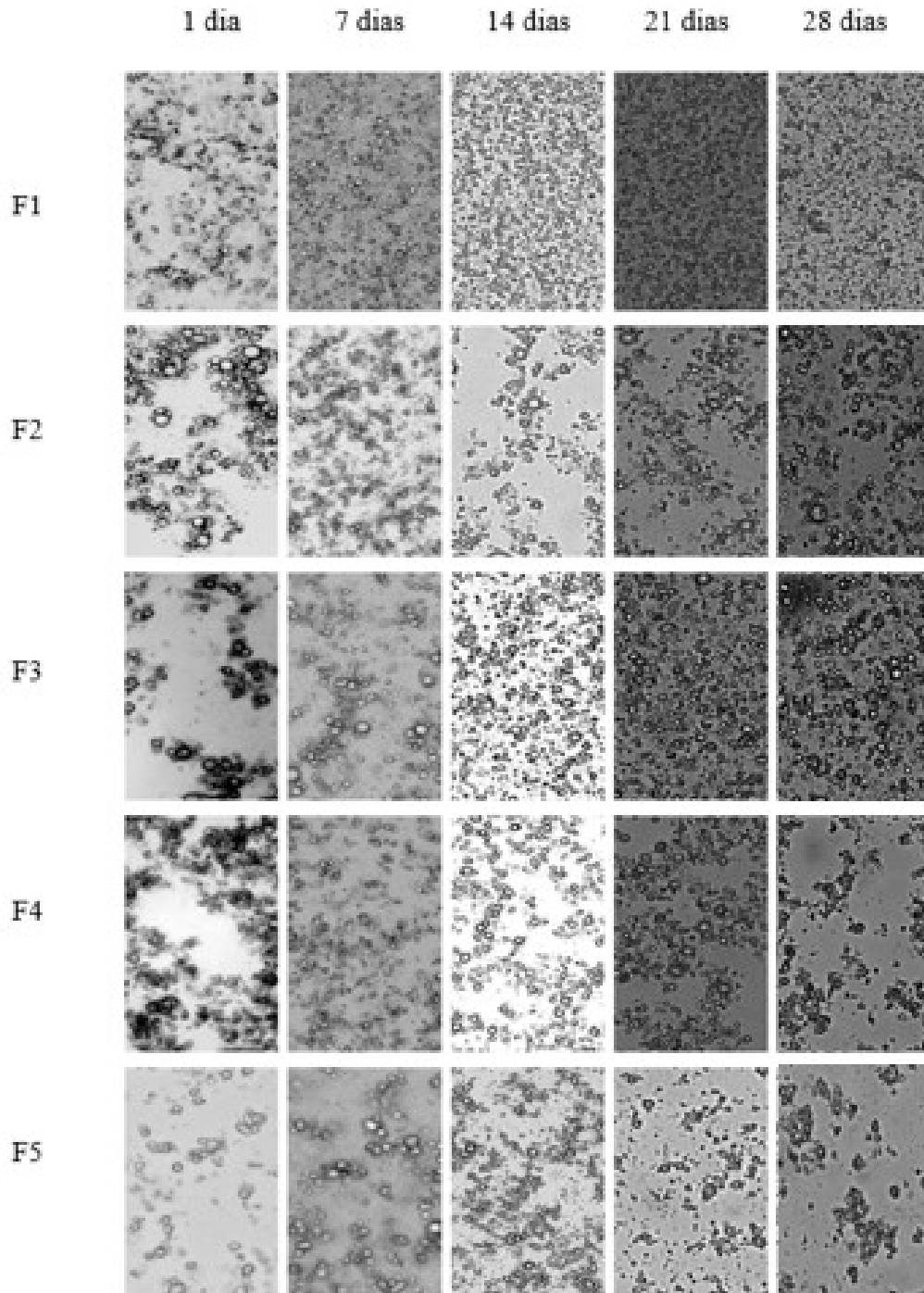
As imagens de microscopia óptica das formulações F1 a F5 expostas a 25°C e 45°C por 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias estão apresentadas na Figuras 17 e 18. Foram obtidas através da observação das microestruturas das emulsões em microscópio óptico com aumento de 40 vezes.

Figura 17 – Resultado da microscopia óptica das emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de extrato), F3 (com antioxidante e conservantes sintéticos), F4 (com 0,5% de extrato e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com conservantes sintéticos e 0,05% de extrato), expostas a estabilidade acelerada a 25°C por 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias, na ampliação de 40X.



Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 18 – Resultado da microscopia óptica das emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de extrato), F3 (com antioxidante e conservantes sintéticos), F4 (com 0,5% de extrato e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com conservantes sintéticos e 0,05% de extrato), expostas a estabilidade acelerada a 45°C por 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias, na ampliação de 40X.



Fonte: Autoria própria (2020).

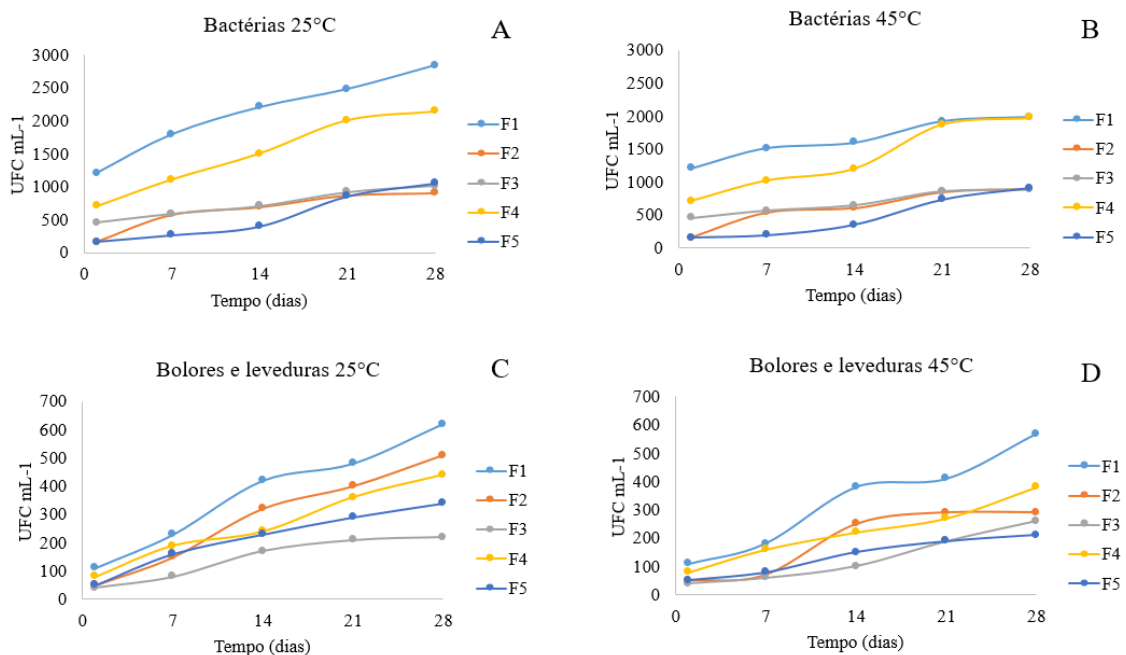
A olho nu, podem ser observados objetos relativamente grandes, enquanto muitas estruturas de interesse em emulsões são microscópicas, como por exemplo, gotas individuais, flocos, cristais de gordura e bolhas de ar (AGUILERA; STANLEY; BARBOSA-CÁNOVAS, 1999; RUSS, 2004). As técnicas de microscopia fornecem informações sobre sistemas

estruturalmente complexos na forma de imagens que podem ser de compreensão relativamente fácil (McCLEMENTS, 2007).

Todas as formulações deste estudo apresentaram o mesmo perfil de tamanho e distribuição das partículas, confirmando os resultados de tamanho de partícula. Nessa perspectiva, Kowalska, Ziomek e Żbikowska (2015) descrevem que a homogeneização causa melhor dispersão das gotas de óleo. Comprovou-se, então, que a velocidade utilizada para a realização das emulsões foi adequada para o estudo.

Na Figura 19, foram expostos os resultados referentes a contagem de bactérias, fungos e leveduras das emulsões F1 a F5 expostas a 25°C e 45°C por 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias.

Figura 19 - Contagem de bactérias, fungos e leveduras em UFC mL⁻¹ das emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA-DCM), F3 (com antioxidante e antimicrobianos sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com antimicrobianos sintéticos e 0,05% de PA-DCM), expostas a estabilidade acelerada. A – Contagem de bactérias das formulações expostas a 25°C. B - Contagem de bactérias das formulações expostas a 45°C. C - Contagem de fungos das formulações expostas a 25°C. D - Contagem de fungos das formulações expostas a 45°C.



Houve diferença significativa comparando a formulação F1 com as formulações F2, F3, F4 e F5 em todos os tempos, analisadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2020).

Verificou-se que a formulação F1, exposta a 25°C, apresentou um aumento de bactérias, sendo de 1210 UFC mL⁻¹ no primeiro dia da estabilidade para 2840 UFC mL⁻¹ após 28 dias, assim como a amostra exposta a 45°C, apresentando um aumento de bactérias de 1210 UFC mL⁻¹ para 1990 UFC mL⁻¹.

A formulação F2, exposta a 25°C, teve um aumento de 160 UFC mL⁻¹ para 910 UFC mL⁻¹, assim como a amostra exposta a 45°C, de 160 UFC mL⁻¹ para 900 UFC mL⁻¹.

Já para a formulação F3, exposta a 25°C, mostrou, no primeiro dia da estabilidade, 460 UFC mL⁻¹ e, após 28 dias, teve um aumento para 1010 UFC mL⁻¹, assim como a emulsão exposta a 45°C, que apresentou um aumento de 460 UFC mL⁻¹ para 890 UFC mL⁻¹.

A formulação F4 apresentou resultado de 710 UFC mL⁻¹ no primeiro dia de estudo e de 2150 UFC mL⁻¹ exposta a 25°C e de 1980 UFC mL⁻¹ a exposta a 45°C, após 28 dias.

A formulação F5, exposta a 25°C, assim como as demais formulações, demonstrou um aumento de bactérias do primeiro dia da estabilidade para o final do tempo de estudo, de 160 UFC mL⁻¹ para 1050 UFC mL⁻¹, e a amostra exposta a 45°C, de 160 UFC mL⁻¹ para 910 UFC mL⁻¹.

Dessa forma, observou-se que apenas as formulações F1 e F5 expostas a 25°C apresentaram resultados acima de 2000 UFC mL⁻¹. As demais formulações em diferentes temperaturas apresentaram resultado abaixo de 2000 UFC mL⁻¹, estando de acordo com o que é recomendado pela USP (2020).

Ademais, as formulações F2, F3 e F5 apresentaram coerência entre os resultados, visto que a F3 e F5 possuem em sua composição conservantes antimicrobianos sintéticos e a formulação F2 possui PA-DCM que apresentou atividade antimicrobiana, inibindo de forma significativa o crescimento bacteriano em relação ao controle (F1). No entanto, a formulação F4 que possui a mesma quantidade de PA-DCM em relação à F2 apresentou crescimento bacteriano superior. Esta diferença pode ser em decorrência da interação entre o extrato e os antioxidantes compostos na fórmula, apresentando uma pequena inibição da ação do extrato como conservante contra bactérias.

Para a contagem dos fungos, foi constatado um aumento no decorrer do tempo, para F1, quando exposta a 25°C, de 110 UFC mL⁻¹ para 620 UFC mL⁻¹, e de 110 UFC mL⁻¹ para 570 UFC mL⁻¹ para a amostra exposta a 45°C. Sendo a formulação que mais apresentou crescimento. Este resultado é coerente visto que esta foi a emulsão controle, sem presença de conservantes.

Esse aumento também foi verificado na formulação F2, exposta a 25°C, sendo de 50 UFC mL⁻¹ para 510 UFC mL⁻¹ e, quando exposta a 45°C, de 50 UFC mL⁻¹ para 290 UFC mL⁻¹. Também houve aumento de fungos e leveduras na formulação F4, a qual, no primeiro dia da estabilidade, apresentou 80 UFC mL⁻¹ e, após 28 dias exposta a 25° e 45°C, mostrou o resultado de 440 UFC⁻¹ mL e 380 UFC mL⁻¹, respectivamente. Estes resultados estão de acordo devido as duas formulações apresentarem mesma concentração de extrato com atividade conservante.

Os resultados de fungos e leveduras obtidos para a formulação F3 também apresentaram aumento, de 40 UFC mL⁻¹ para 220 UFC mL⁻¹ para a amostra exposta a 25°C e de 40 UFC mL⁻¹ para 260 UFC mL⁻¹ para a amostra exposta a 45°C.

A formulação F5 apresentou resultado de 50 UFC mL⁻¹ no primeiro dia de estabilidade e de 340 UFC mL⁻¹ e 210 UFC mL⁻¹ após 28 dias exposta a 25° e 45°C, respectivamente.

As formulações com conservantes antimicrobianos ou PA-DCM impediram significativamente o crescimento bacteriano e fúngico. Isto demonstra a eficiência da fração de diclorometado da planta *P. angustifolium* como conservante quando adicionada em uma emulsão.

Também foram verificados microrganismos específicos em todas as formulações, sendo eles: *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. O único microrganismo presente em todos os tempos, nas duas temperaturas de armazenamento e em todas as formulações foi a *E. coli*. Os demais patógenos estavam ausentes. Esse resultado pode ser explicado devido a provável contaminação na elaboração das fórmulas. Além disso, na determinação da concentração inibitória mínima foi verificado que PA-DCM não apresentou atividade contra *E. coli* na concentração adicionada à formulação.

Segundo Miranda (2013), existem evidências que reforçam sobre o aumento da capacidade da resistência da *E. coli* aos agentes tradicionalmente usados na conservação. Podendo explicar o crescimento de *E. coli* na formulação F3, com conservantes sintéticos.

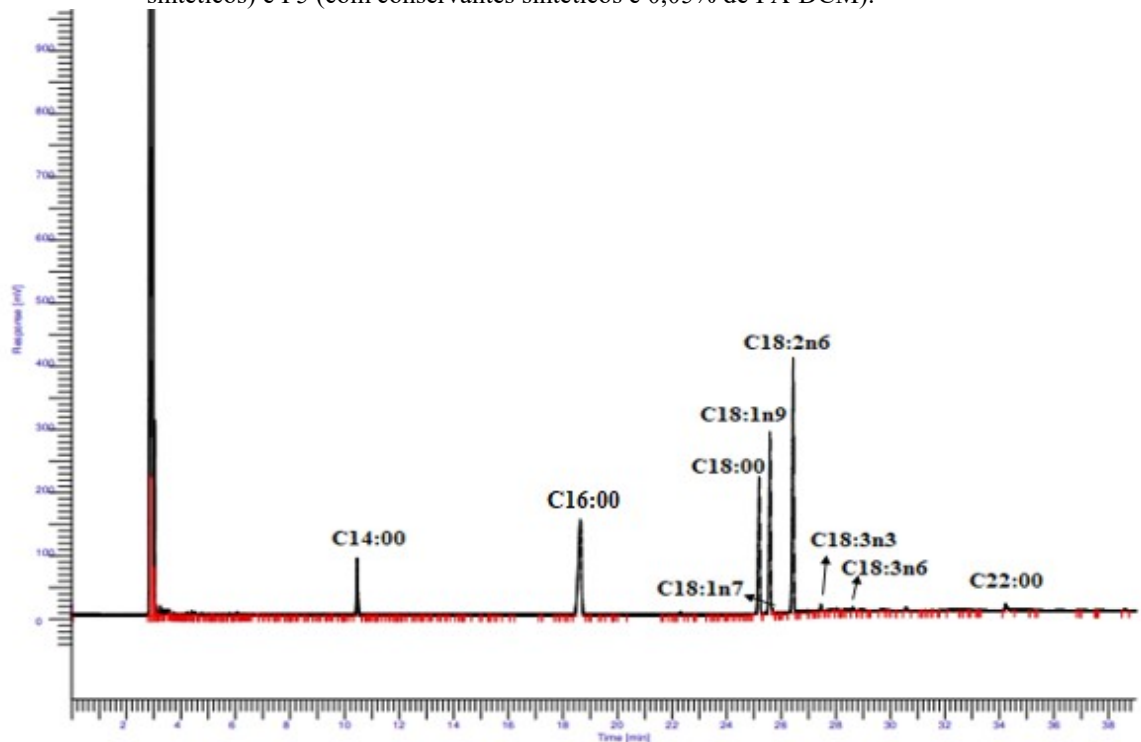
Yuan et al., (2013) demonstrou que pode ser facilmente verificado que o crescimento de microrganismos está ligado à desestabilização da emulsão, assim como o tempo é outro requisito na desestabilização da emulsão. Neste estudo, foi verificado que ocorreu um aumento das bactérias, fungos e leveduras. Porém, levando em consideração todos os outros testes realizados na estabilidade acelerada das emulsões, verificou-se que os microrganismos em questão não foram suficientes para desestabilizar a emulsão. Assim como descrito por Liu e Yang (2010), as informações fornecidas serão úteis para desenvolvedores de produtos alimentícios interessados em usar extratos naturais como um sabor ou agente antimicrobiano natural em sistemas alimentícios de emulsão óleo em água. O estudo provou que as emulsões podem ser armazenadas com segurança microbiológica para uso na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e agrícola.

5.5.3 Ácidos graxos

As emulsões foram avaliadas nos tempos 24 horas e 28 dias, em condições forçadas estabelecidas inicialmente, para avaliação da degradação dos ácidos graxos majoritários presentes.

Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção de padrões conhecidos com os tempos de retenção das formulações (F1, F2, F3, F4 e F5) do tempo 1 dia e das formulações expostas a 25°C e 45°C, após 28 dias. Na Figura 20, pode-se verificar um cromatograma típico dos ésteres de ácidos graxos encontrados nas formulações.

Figura 20 – Cromatograma dos ácidos graxos encontrados nas emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de PA_DCM), F3 (com antioxidante e conservantes sintéticos), F4 (com 0,5% de PA-DCM e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com conservantes sintéticos e 0,05% de PA-DCM).



Fonte: Autoria própria (2020).

Na Tabela 8 os percentuais para cada ácido graxo avaliado neste trabalho são apresentados sendo os resultados para as formulações das emulsões antes de serem submetidas a estabilidade acelerada e resultados após o período de oxidação forçada.

Tabelas 08 – Percentual de ácidos graxos encontrados nas emulsões F1 (controle), F2 (com 0,5% de extrato), F3 (com antioxidante e conservantes sintéticos), F4 (com 0,5% de extrato e com antioxidantes sintéticos) e F5 (com conservantes sintéticos e 0,05% de extrato), no primeiro dia da estabilidade e após 28 dias expostas a 25°C e 45°C em porcentagem.

		%		
Formulações		1 dia	28 dias 25°C	28 dias 45°C
C14:0 Ácido mirístico	F1	0,04	0,00	0,03
	F2	0,17	0,05	0,37
	F3	5,21	7,88	8,24
	F4	3,62	8,51	6,76
	F5	0,17	0,29	0,32
C16:0 Ácido palmítico	F1	24,64	15,40	17,71
	F2	18,26	25,50	21,53
	F3	23,71	23,59	30,52
	F4	18,25	25,25	23,01
	F5	16,84	25,53	23,55
C18:0 Ácido esteárico	F1	18,48	22,64	8,08
	F2	12,29	16,14	13,22
	F3	20,56	17,45	20,17
	F4	14,80	16,21	16,70
	F5	10,94	19,02	15,00
C18:1n9 Ácido oleico	F1	22,97	24,61	29,95
	F2	27,12	24,99	25,58
	F3	20,01	20,78	33,76
	F4	25,70	20,04	21,35
	F5	28,77	22,50	24,05
C18:1n7 Ácido vacênico	F1	0,45	0,48	0,48
	F2	0,48	0,39	0,37
	F3	0,33	0,34	0,54
	F4	0,41	0,30	0,35
	F5	0,43	0,36	0,37
C18:2n6 Ácido linoleico	F1	31,95	33,99	42,22
	F2	42,20	38,24	36,80
	F3	28,95	28,48	4,42
	F4	35,92	28,35	29,49
	F5	41,25	30,60	33,65
C18:3n3 α – linolênico	F1	0,86	1,00	0,90
	F2	0,90	0,76	0,72
	F3	0,46	0,61	1,18
	F4	0,74	0,54	0,64
	F5	0,87	0,65	0,69
C18:3n6 γ – linolênico	F1	0,41	0,92	0,45
	F2	0,45	0,39	0,42
	F3	0,62	0,34	0,59

	F4	0,31	0,30	0,42
	F5	0,37	0,40	0,41
C22:0 Ácido behênico	F1	0,20	0,96	0,16
	F2	0,16	1,77	0,97
	F3	0,16	0,53	0,59
	F4	0,24	0,50	1,28
	F5	0,37	0,65	1,97
Total de ácidos graxos insaturados	F1	56,64	61,00	74,00
	F2	71,15	64,77	63,52
	F3	50,04	50,55	40,49
	F4	63,08	49,53	51,90
	F5	71,69	54,51	59,17
Total de ácidos graxos saturados	F1	43,36	39,00	26,00
	F2	28,85	35,23	36,48
	F3	49,96	49,45	59,51
	F4	36,92	50,47	48,10
	F5	29,31	45,49	40,83

Fonte: Autoria própria (2020).

Os ácidos graxos com maior quantidade nas formulações foram, ácido palmítico (C16:00), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1n9) e ácido linoleico (C18:2n6).

Verificou-se que o antioxidante natural (PA-DCM) apresentou mesmo comportamento nas diferentes concentrações colocadas nas fórmulas (F2, F4 e F5), sendo eficazes independente de sua concentração. Assim como, o antioxidante sintético presente na formulação F3, apresentou semelhança nos resultados encontrados nas formulações F2, F4 e F5 com o antioxidante natural PA-DCM. Tornando robusto os resultados encontrados na análise de DPPH, onde também observamos que a eficácia da fração do extrato natural apresenta potencial de atividade antioxidante tal qual a dos antioxidantes sintéticos.

Analisando os resultados pode-se verificar que os extratos apresentaram atividade conservante, pois não demonstram diferença em concentrações distintas e nem em decorrência do tempo e temperatura.

Conforme Tabela 8, as formulações apresentaram maior quantidade de ácidos graxos insaturados do que saturados e como descrito por Glass e Johnson (2004), a atividade conservante é maior para ácidos graxos insaturados do que para formas saturadas.

Não houve diferença entre os tempos (1 e 28 dias) e as temperaturas (25 e 45 °C) para a análise de ácidos graxos. Oxidação e peroxidação lipídica levam a formação de ácidos graxos livres e peróxidos que elevam a acidez e diminuem o pH das formulações. Essas alterações podem ser percebidas também pela alteração na condutividade elétrica e percebeu-se que

durante o tempo de acompanhamento não foram observadas diferenças na composição em ácidos graxos das formulações, o que pode ser um indício da ação antioxidante das formulações. Em decorrência disso este experimento não foi realizado em triplicata.

Também foi observado que ácido vacênico, ácido oleico, α – linolênico, γ – linolênico e ácido linoleico são insaturados e como descrito por Messyasz et al. (2017), são valiosos materiais para a produção de produtos cosméticos, por serem naturais e ecologicamente corretos. Os ácidos graxos insaturados são altamente benéficos para a pele, pois fazem parte de sua estrutura. Por esse motivo, cremes, condicionadores ou máscaras utilizando como base esta formulação representam uma nova linha de cosméticos ecológicos, que não só contribuem para a melhoria da nossa pele, mas também são provenientes de materiais biológicos naturais renováveis.

Ademais, a fração PA-DCM apresentou propriedade conservante, podendo ser utilizada como antimicrobiano e antioxidante natural em formulações alimentares obtendo um prolongamento da vida útil dos produtos e benefícios por ser de origem natural.

CONCLUSÃO

Desenvolver uma formulação de origem natural requer várias etapas, desde a extração da matéria prima à informação repassada ao consumidor quanto a características e propriedades dos compostos presentes. Sendo assim, avaliaram-se as concentrações inibitória mínima e bactericida mínima, junto ao perfil antioxidante de extratos e frações das espécies *Pterocaulon angustifolium*, *Praxelis sanctopaulsensis* e *Disynaphia filifolia* a fim de conhecer suas potencialidades. Desta forma, foi possível desenvolver uma emulsão incorporada com o extrato que apresentou elevada atividade antioxidante e melhor atividade antimicrobiana e avaliar sua ação conservante por meio de estudos de estabilidade.

Foi observado que o produto que se destacou em relação às atividades biológicas foi a fração extraída pelo solvente diclorometano da planta *P. angustifolium* (PA-DCM). Na sequência, foi construída a curva de cinética de morte bacteriana com esta fração, determinando o tempo para a que exerça atividade bacteriostática e bactericida. PA-DCM foi utilizada no desenvolvimento das emulsões, às quais foram expostas a testes de estabilidade preliminar e acelerada. A realização do estudo de estabilidade é fundamental para garantir a segurança, eficácia e qualidade do produto e que a emulsão testada atende estes parâmetros. Desta forma, foi possível verificar que PA-DCM apresentou atividade conservante.

Assim, observou-se que PA-DCM consiste em um produto natural que apresenta atividade antimicrobiana e antioxidante, assim como demonstra ação conservante quando adicionado emulsões, de modo que sua aplicação pode ser direcionada para as áreas farmacêuticas, agrícolas, cosméticas e alimentares.

REFERÊNCIAS

A GLASS, K.; A JOHNSON, E. Antagonistic effect of fat on the antibotulinal activity of food preservatives and fatty acids. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 21, n. 6, p. 675-682, dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2004.03.002>.

ABREU, V. H. R.; ESTEVES, R. L.; GONÇALVES-ESTEVES, V. **Palinologia de Praxelis (Praxelinae–Eupatorieae–Asteraceae)**. 64º Congresso Nacional de Botânica. Belo Horizonte, nov.2013.

ACHKAR, M. T. et al. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: importância na dieta e na conservação de alimentos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 398-406, dez. 2013. Universidade Vale do Rio Verde (UninCor). <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrd.v11i2.398406>.

AGUILERA, J. M.; STANLEY, D. W.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. **Microstructural Principles of Food Processing Engineering**. Gaithersburg, USA: Aspen Publishers, 1999.

AGOSTINHO, L. C. Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsão cosméticas à base de óleo de urucum (*Bixa orellana*, L) e café verde (*Coffea arabica*, L). 2017. 103 f. **Dissertação (Mestrado)**. Curso de Ciências, Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

ALBUQUERQUE, M. F. M. A segurança alimentar e nutricional e o uso da abordagem de direitos humanos no desenho das políticas públicas para combater a fome e a pobreza. **Revista de Nutrição**, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 895-903, dez. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-52732009000600011>.

ALENCAR, M. et al. *Klebsiella pneumoniae*: uma revisão bibliográfica. **Mostra Científica em Biomedicina**, v. 1, n. 1, 2016.

ALEXANDER, K. **Handbook of presevatives: corn oil**. 6. ed. London: Pharmaceutical Press, p. 917, 2009.

ALMEIDA, M. P. et al. Explorando a química e a atividade antifúngica de óleos essenciais: Uma proposta de projeto para a Educação Básica. **Latin American Journal of Science Education**, v. 2, 2015.

ALVES, F. C.B. et al. Short communication: inhibitory activities of the lantibiotic nisin combined with phenolic compounds against staphylococcus aureus and listeria monocytogenes in cow milk. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 99, n. 3, p. 1831-1836, mar. 2016. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10025>.

AMARAL, W. Prospecção de espécies aromáticas silvestres do Campos Gerais da Mata Atlântica do Paraná. 2015. 138 f. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-graduação em Agronomia. Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2015.

AMPARO, T. R. et al. Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. **Infarma Ciências Farmacêuticas**. 2017. v. 30. 1 ed. p. 50–59, 2017.

ANDRADE, R. Q. et al. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões alimentícias contendo óleo de pequi. **Higiene Alimentar**, Montes Claros, v. 32, p. 284-285, set./out. 2018.

ANDRÉ, S.; VALLAEYS, T.; PLANCHON, S. Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. **Research In Microbiology**, [S.L.], v. 168, n. 4, p. 379-387, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.003>.

ANDREO, D.; JORGE, N. **Antioxidantes naturais: técnicas de extração**. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 24, n. 2, p. 319-326, 2006.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2014. **Resolução RDC n. 26 de 13 de maio de 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Ministério da Saúde. Brasília, 2014.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **28**: Guia de Estudos de Estabilidade. 1 ed., p. 47, 2019.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, p. 52, 2004.

ASTERACEAE. Chicago: Encyclopædia Britannica, Inc., 2019.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Trad. Ortega, et al. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 504-536, 2005

AZEVEDO, J. O. Correlação entre tamanho de gotas, propriedades reológicas e estabilidade elétrica de emulsões de água em óleo: um estudo aplicado a fluidos de perfuração. 2016. 41 f. **TCC (Graduação)**. Curso de Química do Petróleo, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

BATISTA, R. D. et al. Contaminação por bacillus cereus e os riscos gerados através da intoxicação alimentar. **Revista Desafios**, Palmas, v. 5, n. 2, p.1-11, 30 jun. 2018.

BECHER, P. **Emulsions theory and practice**. 3rd edition, New York, Oxford University Press Inc., 1957.

BELOTI, V. et al. Frequency of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. **Revista de Microbiologia**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 137-140, abr. 1999. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0001-37141999000200009>.

BIASUS, A. P. et al. Avaliação da multiplicação de *Listeria monocytogenes* e da atividade antimicrobiana do Biomax D® em nata. **Revista de Ciências Agrárias**, [S.L.], v. 39, n. 2, p.216-221, jul. 2016. Sociedade de Ciências Agrarias de Portugal. <http://dx.doi.org/10.19084/rca15084>.

BORDIM, J. Aplicação de antioxidantes naturais na indústria de alimentos: avaliação química e de percepção do consumidor. 2020. **Dissertação**. Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2020.

BOROSKI, M. et al. **Antioxidantes Princípios e Métodos Analíticos**, 1. ed. – Curitiba, Appris, 2015.

BOSKOVIC, M. et al. Antioxidative Activity of Thyme (*Thymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oils and Their Effect on Oxidative Stability of Minced Pork Packaged Under Vacuum and Modified Atmosphere. **Journal Of Food Science**, [S.L.], v. 84, n. 9, p. 2467-2474, 26 ago. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.14788>.

CALEJA, C. et al. Obtenção de conservantes e bioativos a partir de matrizes naturais e sua aplicação em produtos alimentares. In: **IX Congresso ibérico de agroengenharia**. Instituto Politécnico de Bragança, 2017.

CARMONA-JIMÉNEZ, Y. et al. Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 165, p. 198-204, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.106>.

CASTRO, R. M. L. **Emulsão: uma revisão bibliográfica**. 2014. 59 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

CATALÁ CASTELI, V. et al. Desenvolvimento e estudos de estabilidade preliminares de emulsoes O/A contendo Cetoconazol 2,0%. **Acta Scientiarum: Health Sciences**, v. 30, n. 2, p. 121-121, 2018.

CHEN, B.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Role of Continuous Phase Anionic Polysaccharides on the Oxidative Stability of Menhaden Oil-in-Water Emulsions. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 58, n. 6, p. 3779-3784, 24 mar. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf9037166>.

CHIERICI, Y. R. et al. Estudo químico das frações clorofórmica e polares de *Disynaphia filifolia* (HASSL.) RM KING & H. ROB. (*Asteraceae*). **27º Encontro Anual de Iniciação Científica. 7º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior**. Ponta Grossa, 02 e 03 de outubro. 2018.

CLSI - Methods for Determining Bactericidal Activity of antimicrobial Agentes. **Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2016.

COELHO, J. A. Avaliação *in vitro* das atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica de extratos orgânicos das cascas da do fruto jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg). 2017. 57f. **Dissertação de Mestrado**. Ciências Farmacêuticas. Área de Fármacos e Medicamentos. Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Cascavel, 2017.

DA CUNHA, F. P. L. et al. *Shigella sp*: Um problema de saúde pública. **Higiene Alimentar**, v. 31, p. 264-265, 2017.

DA SILVA, B. P. et al. Avaliação da estabilidade da capacidade antioxidante e de parâmetros físico-químicos de néctares de frutas caseiros. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 75, p. 1705, 2016.

DA SILVA, E. M. A gênese sócio – histórica do homem e a resolução neolítica. **Revista de Ciências Humanas ReAGES**, v. 1, n. 2, p. 12-30, 2018.

DA SILVA SARAIVA, A. F. et al. Cadeia produtiva do babaçu em Cidelândia – MA: Uma análise a partir da abordagem de cadeia global de valor. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional**, v. 15, n. 2, 2019.

DAI, L.; HINRICHS, J.; WEISS, J. Ionic strength and pH stability of oil-in-water emulsions prepared with acid-hydrolyzed insoluble proteins from *Chlorella protothecoides*. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [S.L.], v. 100, n. 11, p. 4237-4244, 20 maio 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.10464>.

DE MELO, K. N. M.; BORTOLIN, G. S.; DA SILVA, A. C. F. Estudo da germinação de sementes de *Aster squamatus* (Spreng.) Hiero. e *Pterocaulon polystachyum* DC. **Revista Científica Rural**, v. 18, n. 1, p. 29-41, 2016.

DINI, V. S. Q. **Análise da resistência antimicrobiana em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em unidades de tratamento intensivo em manaus.** 2016. 137 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

DUBASH, D.; SHAH, U. **Handbook of presevatives: water.** 6. ed. London: Pharmaceutical Press, p. 917, 2009.

EHRHARDT, D. D. Produção de biossurfactantes por bacillus subtilis utilizando resíduo do processamento do abacaxi como substrato. 2015. 96 f. **Dissertação (Mestrado)** - Curso de Engenharia de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

FARIAS, R. C. B. Resistência a antibióticos em *Staphylococcus aureus*. 2008. 48 f. **Dissertação (Mestrado)** - Curso de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

FERNANDES, A. C.; RITTER, M. R. A família *Asteraceae* no Morro Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, 2009.

FREITAS, I. R. Caracterização físico-química e avaliação dos compostos bioativos de óleos brutos e refinados de soja, canola, milho e girassol. 2015. 152 f. **Tese (Doutorado)** - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2015.

FRIEDRICH, M. et al. Avaliação da estabilidade físico químico de creme não iônico inserido no formulário nacional. **Latin American Journal Of Pharmacy**, Santa Maria, v.4, n. 26, p. 558-562, abr. 2007.

GALVÃO, K. C. S. **Desenvolvimento de nanoemulsão para o uso em alimentos e uso tópico.** 2015. 255 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

GARCIA, K. C. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana da polpa do fruto de *Eugenia brasiliensis* Lam. 2016. 168f. **Dissertação de Mestrado.** Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista/UNESP. Araraquara, 2016.

GARCÍA, M. C. et al. Rheology, microstructural characterization and physical stability of W/ α -PINENE/W emulsions formulated with copolymers. **Colloids And Surfaces A:**

Physicochemical and Engineering Aspects, [S.L.], v. 536, p. 125-132, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.07.029>.

GELLEN, L. F. A.; SILVA, E. H. C. Atividade antimicrobiana de extratos de raízes de *Byrsonima crassifolia*. **Journal Of Bioenergy And Food Science**, [s.l.], p.63-71, 29 jun. 2016. Instituto Federal do Amapa. <http://dx.doi.org/10.18067/jbfs.v3i2.88>.

GONÇALVES, A. E. S. S. Avaliação da capacidade antioxidante de frutos e polpa frutas nativas e determinação de teores de flavonoides e vitamina C. 2008. 88 f. **Dissertação (Mestrado)** - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GOUVEA, F. S.; ROSENTHAL, A.; FERREIRA, E. H. R. Plant extract and essential oils added as antimicrobials to cheeses: a review. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 47, n. 8, 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160908>.

GROKOVISKI, L.; CERVI, A. C.; TARDIVO, R. C. O gênero *Piptocarpha* R.Br. (Asteraceae: vernonieae) no estado do paraná, brasil. **Acta Botanica Brasilica**, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 486-498, jun. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-33062009000200020>.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 3, p.667-679. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010000300035>.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. **Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids**. Laboratory Practice, v. 22, p. 474-476, 1973.

HATTORI, E.K.O. **Disynaphia in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2014.

IBERIAN COPPERS S.A. **A história dos óleos essenciais**. 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos: óleos e gorduras**. 5ª ed., Ed. São Paulo: São Paulo, 2004.

LEVIÉ, S. et al. Characterization of sodium alginate/d-limonene emulsions and respective calcium alginate/d-limonene beads produced by electrostatic extrusion. **Food Hydrocolloids**, [S.L.], v. 45, p. 111-123, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.001>.

LIU, F. F.; ANG, C. Y. W.; SPRINGER, D. Optimization of extraction conditions for active components in *Hypericum perforatum* using surface methodology. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 3.364-3.371, 2000.

JONES, A. et al. Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) of antioxidants using reaction flow chromatography. **Analytica Chimica Acta**, [S.L.], v. 967, p. 93-101, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.032>.

KACI, M. et al. Emulsification by high frequency ultrasound using piezoelectric transducer: formation and stability of emulsifier free emulsion. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 1010-1017, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.11.006>.

KHAN, B. A. et al. Development, characterization and antioxidant activity of polysorbate based O/W emulsion containing polyphenols derived from *Hippophae rhamnoides* and *Cassia fistula*. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 49, n. 4, p. 763-773, dez. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-82502013000400016>.

KOWALSKA, M.; ZIOMEK, M.; ŚBIKOWSKA, A. Stability of cosmetic emulsion containing different amount of hemp oil. **International Journal Of Cosmetic Science**, [S.L.], v. 37, n. 4, p. 408-416, 20 mar. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/ics.12211>.

KULMANN, I. S. et al. Preparação e caracterização físico-química de nanopartículas poliméricas contendo metronidazol e óleo de melaleuca co-encapsulados. 2018. 85f. **Dissertação (Mestrado)**. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, Uruguaiiana, 2018.

LAWAL O.S. Funcionalidade do isolado de proteína de alfarroba africana (*Parkia biglobosa*): efeitos do pH, força iônica e várias concentrações de proteína. **Food Chem** v. 86, p. 345–355, 2004.

LEÃO, L. L. et al. Uso de antioxidantes naturais em carnes e seus subprodutos. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 1, p. 94-100, 2017.

LIU, T.; YANG, T. Stability and Antimicrobial Activity of Allyl Isothiocyanate during Long-Term Storage in an Oil-in-Water Emulsion. **Journal Of Food Science**, [S.L.], v. 75, n. 5, p. 445-451, 7 jul. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01645.x>.

LANGE, M. K.; HEBERLÉ, G.; MILÃO, D. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 145-151, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000100018>

LEMES, A. C. et al. Potencial Antioxidante de Proteínas Extraídas de Feijão Comum (*Phaseolus vulgaris*) cv. BRSMG-Madrepérola. **Uniciências**, [s.l.], v. 22, n. 3, p. 38, 24 jan. 2019. Editora e Distribuidora Educacional. <http://dx.doi.org/10.17921/1415-5141.2018v22n3espp38-42>.

LENTZ, S. A. M. Ocorrência de *Bacillus cereus* em surtos de doenças transmitidas por alimentos notificados e investigados no município de porto alegre de 2003 a 2013. 2014. 38 f. **TCC (Graduação)** - Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

LIBÓRIO, J. F. A. Caracterização físico-química do extrato seco das sementes de *Myrciaria dubia* (*kunth*) *mcvaugh* e desenvolvimento de formulação semissólida. 2016. 110 f. **Dissertação (Mestrado)**. Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

LIMA, C. G. et al. Development and evaluated the physical stability O/W emulsions containing babassu oil (*Orbignya oleifera*). **Rev. Bras. Farm.**, Cuiabá, v. 3, n. 89, p. 239-245, fev. 2008.

LIMA, L. F. P.; MATZENBACHER, N. I. O gênero *Pterocaulon* Ell. (*Asteraceae* – *Plucheeae*) no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia: Sér. Bot**, Porto Alegre, v. 63, n. 2, p.213-229, jul/dez. 2008.

MAIA, E. L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixe. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 53, pg. 27-35, 1993.

MAKAN, A. C. et al. Advanced analysis of polymer emulsions: particle size and particle size distribution by field-flow fractionation and dynamic light scattering. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1442, p. 94-106, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.03.013>.

MALINOWSKA, P.; GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A.; SZYMUSIAK, H. Protective effect of commercial acerola, willow, and rose extracts against oxidation of cosmetic emulsions containing wheat germ oil. **European Journal Of Lipid Science And Technology**, [S.L.], v. 116, n. 11, p. 1553-1562, 16 jul. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201300514>.

MARTINS, A. C. et al. The antioxidant activity of teas measured by the FRAP method adapted to the FIA system: optimising the conditions using the response surface methodology: Optimising the conditions using the response surface methodology. **Food Chemistry**, [s.l.], v.

138, n. 1, p. 574-580, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.143>.

McCLEMENTS, D. J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, p. 611-649, 2007.

MELO JR, J. C. F.; BOEGER, M. R. T. Riqueza e estrutura de uma comunidade vegetal de dunas na planície costeira de Santa Catarina. **Iheringia. Série Botânica**. v. 73, n. 3, p. 290-297, 2018.

MESSYASZ, B. et al. Valuable natural products from marine and freshwater macroalgae obtained from supercritical fluid extracts. **Journal Of Applied Phycology**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 591-603, 7 set. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-017-1257-5>.

MIRANDA, A. C. Perfil de resistência a antimicrobianos de *Escherichia coli*. 2013. 42 f. **Dissertação (Mestrado)**. Curso de Ciências e Tecnologia, Ubêrlandia, 2013.

MIODUSKI, J.; MORO, R. S. Grupos funcionais da vegetação campestre de Alagados, Ponta Grossa, Paraná. **Iheringia. Série Botânica.**, v. 66, n. 2, p. 241-256, 2011.

MOURE, A. et al. Antioxidant activity of extracts produced by solvent extraction of almond shells acid hydrolysates. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 101, n. 1, p. 193-201, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.017>.

MORAIS, G. G. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide. 2006. 181 f. **Dissertação (Mestrado)**. Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

MORENO, B. P. et al. Avaliação da atividade nematicida das frações de *Pterocaulon angustifolium*. **DC. (Asteraceae)**. Maringá, 2019.

MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella spp.*** Brasília: Editora MS, 2011. 64 p. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-salmonella-spp-web.pdf>>. Acesso em: 22 de junho de 2019.

NAKAJIMA, J.N. et al. ***Asteraceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents**: Approved guideline M26-A. Wayne, Pennsylvania, USA, 1999.

NGUYEN, D.; BALSAMO, V.; PHAN, J. Effect of Diluents and Asphaltenes on Interfacial Properties and Steam-Assisted Gravity Drainage Emulsion Stability: interfacial rheology and wettability. **Energy & Fuels**, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 1641-1651, 14 nov. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ef401880y>.

NÓBREGA H.N. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de produtos antissépticos por meio de técnica time kill. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo. v. 72, n.3, p. 226-33, 2013.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, [s.l.], v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422009000300013>.

OLIVEIRA, A. P. et al. *Salmonella enterica*: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 9, n. 16, p.1947-1972, 01 jul. 2013.

OLIVEIRA, M. C. S. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade preliminar de uma emulsão cremosa contendo cafeína para o tratamento da *Lipodistrofia ginóide* por massagem. 2018. 55 f. **TCC (Graduação)**. Curso de Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

PAULA, C. M. D. Avaliação da resistência térmica, ácida e a desinfetantes de cepas de *Escherichia coli* isoladas no sul do Brasil. 2014. 136 f. **Tese (Doutorado)**. Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

PAIVA, C. E. Q. et al. O uso racional de fitoterápicos e a farmacovigilância. 2015. **Mostra Científica da Farmácia**, v. 2, n. 01, jun. 2015, ISSN 2358-9124.

PALVAI, V. R.; MAHALINGU, S.; UROOJ, A. Abrus precatorius Leaves: antioxidant activity in food and biological systems, pH, and temperature stability. **International Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 2014, p. 1-7, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/748549>.

PETENUCCI, M. E.; MENEGAZZO, M. L.; FONSECA, G. G. From food waste to by-product: effect of chemical refining on quality of roasted pork greasy residue. **Journal Of Cleaner Production**, [S.L.], v. 177, p. 254-261, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.12.157>.

PEREIRA, L. J. B.; GARCIA-ROJAS, E. E. Emulsões múltiplas: formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 45, n. 1, p. 155-162, jan. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140315>.

PEREIRA, S. M. S. G. *Pseudomonas aeruginosa* em ambiente termal: prevalência e determinantes de patogenicidade. Coimbra: [S.N.], 2013. **Tese de doutorado**. 2013. Disponível: <http://hdl.handle.net/10316/23959>.

PEREZ, M. K. Estratégias de dispersão de sementes no Bioma Cerrado: considerações ecológicas e filogenéticas. 2016. 356f. **Tese de Doutorado**. Botânica do Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília. Brasília, 2016.

QUEIROZ, T. M.; GOMES, C. F.; ALVES, M. A. S. G. Alcachofra (*Cynara scolymus* L., *Asteraceae*): uma fonte promissora de atividades biológicas. **Revista Campo do Saber**, v. 1, n. 2, 2015.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

ROSA, F. G. et al. Critical issues for *Klebsiella pneumoniae* KPC-carbapenemase producing *K. pneumoniae* infections: a critical agenda. **Future Microbiology**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 283-294, fev. 2015. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.14.121>.

ROSKOV Y. et al. Species 2000 & ITIS. **Catalog of Life Naturalis**, Leiden, Holanda, 2018.

ROSKOV Y. et al. Espécie 2000. **Catálogo Itis de Life Naturalis**, Leiden, p.124, 2018.

RUSS, J.C. **Image Analysis of Food Microstructure**. Boca Raton, FL:CRC Press, 2004

SAAD, B. Greco-arab and islamic herbal medicine: a review. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, n.3, p. 249-258, 2014.

SANTOS, A. L. R. Avaliação do sistema conservante em formulações com extratos hidroalcolóico de *Schinus terebinthifolius* Raddi. 2007. 112 f. **Dissertação (Mestrado)**. Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 6, p. 413-423, dez. 2007.

SANTOS, Ludymilla Célia Sousa et al. Prospecção da *Chaptalia nutans (L.) polack-Asteraceae* para fins medicinais e meio agrícola. **Anais do Seminário de Pesquisa e Inovação Tecnológica-SEPIT**, v. 1, n. 1, 2017.

SANTOS, M. A. I. et al. Efeito de diferentes métodos de extração sobre a atividade antioxidante e o perfil de compostos fenólicos da folha de mandioca. **Brazilian Journal Of Food Technology**, v. 19, 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.6715>.

SANTOS, J. J. A.; BORGES, J. H. Atividade antioxidante da erva-mate e lesão celular em exercício agudo de alta intensidade. **Revista Uningá review**, v. 23, n. 1, 2018.

SEIBERT, J. B. et al. Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 287, p. 61-67, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.078>.

SILVA, E. O. O. et al. Lactic acid bacteria with antimicrobial, proteolytic and lipolytic activities isolated from ovine dairy products. **Food Science And Technology**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 293-299, jun. 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/fst.11019>.

SILVA, C. A. P. Avaliação das atividades antioxidante e anticolinesterásica das frações do extrato hexânico de *Polygala boliviensis*. **Anais Seminário de Iniciação Científica**, n. 22, 2019.

SILVA FILHO, J. L. Resistência bacteriana e o papel do farmacêutico na promoção do uso racional de antimicrobianos no âmbito hospitalar. 2016. 47 f. **Monografia (Especialização)**. Curso de Pós-graduação em Farmácia Hospitalar e Clínica, Instituto Nacional de Ensino Superior e Pesquisa Cce, Recife, 2016.

SIQUEIRA, J. C. Avaliação da estabilidade de uma emulsão cosmética cold cream contendo diferentes tipos de ceras. 2016. 27 f. **TCC (Graduação)**. Curso de Química Industrial, Univates, Lajeado, 2016.

SOUZA, C. O. et al. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarréiogênica versátil. **Revista Pan-Amaz Saúde**, Ananindeua, v. 7, n. 2, p. 79-91, junho de 2016 . <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232016000200010>.

SOUSA, E. et al. **Produção de cerâmicas celulares por emulsão seguida de gelificação**. **Cerâmica**, [s.l.], v. 57, n. 341, p.38-44, mar. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0366-69132011000100005>.

STEIN, A. C. et al. Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: antifungal activity of some species of pterocaulon (asteraceae). **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 99, n. 2, p. 211-214, jun. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.02.011>.

TECBIO. **Procedimento operacional padrão da Brasil ecodiesel**: Análise do controle de Qualidade, Fortaleza, 2007.

THIESEN, K. Desenvolvimento de hidratante corporal utilizando produtos naturais. **Engenharia Química-Tubarão**, 2018. 80f. Relatório Técnico/Científico. Curso de Engenharia Química da Universidade do Sul de Santa Catarina. Tubarão. 2018.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras produzidas no Brasil**. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência, Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

TORRES, A. S.; PERONICO, U. L. O.; KOCERGINSKY, P. O. Isolation and identification of staphylococcus aureus health professionals nasopharynx from: a literature review. **Temas em Saúde**, João Pessoa, v. 17, n. 2, p.143-148, 2017.

ULUATA, S.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Riboflavin-induced oxidation in fish oil-in-water emulsions: impact of particle size and optical transparency. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 213, p. 457-461, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.103>.

USP - THE UNITED STATES PHARMACOPEIAS, 43. United States Pharmacopeis Convention Inc, **Rockville**, 2020.

VIEIRA, J. S. et al. Esterificação e transesterificação homogênea de óleos vegetais contendo alto teor de ácidos graxos livres. **Química Nova**, [S.L.], 2017. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170148>.

VON SPERLING, M. **Estudos de modelagem da qualidade da água de rios**. Belo Horizonte: UFMG, 2007. v. 7. 452 p.

XU, M. et al. Pulse seed germination improves antioxidative activity of phenolic compounds in stripped soybean oil-in-water emulsions. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 250, p. 140-147, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.049>.

WALSH, C. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance, **ASM Press**: Washington, 2003.

YUAN, Y. et al. Stability and antimicrobial property of soy protein/chitosan mixed emulsion at acidic condition. **Food & Function**, [S.L.], v. 4, n. 9, p. 1394-1394, 2013. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c3fo60139k>.

YOUSUFI, M. M. et al. Synthesis and evaluation of Jatropha oil-based emulsified acids for matrix acidizing of carbonate rocks. **Journal Of Petroleum Exploration And Production Technology**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 1119-1133, 10 ago. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13202-018-0530-8>.

ZHANG, D. **Handbook of preervatives: sorbitan esters**. 6. ed. London: Pharmaceutical Press, p. 917, 2009.

ZHANG, D. **Handbook of preervatives: polyoxyethylene sorbitan**. 6. ed. London: Pharmaceutical Press, p. 917, 2009.

ZOPELLARO, S. R.; SILVA, S. Z.; LOVATO, F. R. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante da farinha do residuo da uva. **Fag Journal Of Health**, [S.L.], v. 1, n. 2, p. 154-163, 31 jul. 2019. Centro Universitario da Fundacao Assis Gurgacz - Fag Journal Of Health. <http://dx.doi.org/10.35984/fjh.v1i2.84>.

ANEXO

Cromatograma obtidos dos óleos analisados para identificação dos ácidos graxos majoritários, conforme metodologia determinada.

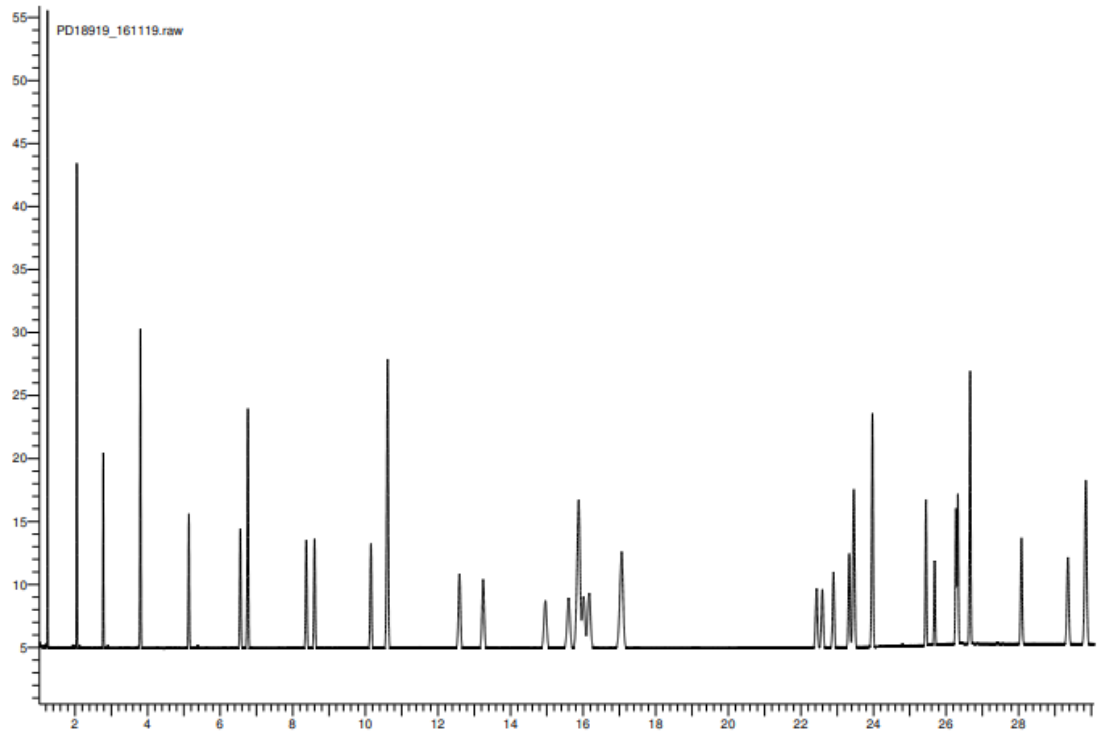


Figura 21 - Cromatograma referencia do óleo analisados para identificação dos ácidos graxos majoritários, presentes nas formulações (F1, F2, F3, F4 e F5).
Fonte: Autoria própria (2020).