

Roniele Balvedi Iacovski Mibielli

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO DE CARVACROL  
COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Tese submetida ao Programa de  
Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia e Biociências da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Doutora em Biotecnologia e  
Biociências

Orientador: Prof. Dr. Marcelo  
Maraschin

Coorientadora: Dra. Leticia Mazzarino

Florianópolis  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mibielli, Roniele Balvedi Iacovski  
DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO DE CARVACROL COM  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA / Roniele Balvedi Iacovski  
Mibielli ; orientador, Marcelo Maraschin,  
coorientador, Letícia Mazzarino, 2019.  
242 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências,  
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Nanoemulsão  
de carvacrol. 3. Atividade antimicrobiana. 4.  
Produto desinfetante. I. Maraschin, Marcelo . II.  
Mazzarino, Letícia . III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Roniele Balvedi Iacovski Mibielli

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO DE CARVACROL  
COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutora e aprovada em sua forma final pelo Programa Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 29 de março de 2019

---

Prof. Glauber Wagner, Dr.  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Marcelo Maraschin, Dr.  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Letícia Mazzarino, Dra.  
Coorientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Robson Marcelo di Piero, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Rosendo Augusto Yunes, Dr.  
Universidade do Vale de Itajaí

---

Luciana Aparecida Honorato, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina



Este trabalho é dedicado ao meu anjo  
Ângelo Elias...



## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores prof. Marcelo Maraschin e Dra. Letícia Mazzarino minha gratidão. Essa caminhada só foi possível porque me deram um voto de confiança. Espero ter correspondido as expectativas.

Aos colegas e pesquisadores do LMBV, pelo acolhimento caloroso e contribuição na realização dos experimentos.

À prof. Shirley Kuhnen, pela colaboração que permitiu a execução dos experimentos microbiológicos.

À Dra. Luciana Aparecida Honorato e à Dra. Maria Beatriz Veleirinho, sempre prontas a ajudar na busca de soluções.

Ao prof. Rosendo Augusto Yunes pela doação do carvacrol.

À SMS/PMF, pela concessão de liberação de jornada de trabalho.

A todos os colegas do LAMUF/SMS/PMF, que partilharam das minhas alegrias e dificuldades durante a realização deste trabalho em especial a Priscila Regina Valverde (guerreira!).

Em especial, à Karin, Samira, Daniela e Thaís, pelas risadas, amizade e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

À minha eterna amiga Marinês “Hai”.

À minha família, minha mãe Nilza exemplo de força, ao meu irmão Vinicius Isac pelo apoio e traduções de última hora. Em especial, ao meu pai Elias, meu maior exemplo de vida, retidão de caráter, paciência e meu BeBem.

Ao meu marido Ângelo, pela paciência, pela compreensão e, principalmente, pelo seu amor. E, ao Ângelo Elias, meu pequeno companheiro, obrigada por ser meu filho, por ser a força para as lutas diárias e por ter trazido cor à minha vida.



*Ando devagar porque já tive pressa  
E levo esse sorriso, porque já chorei  
demais...*

*Hoje me sinto mais forte, mais feliz,  
quem sabe? Só levo a certeza de que  
muito pouco eu sei,  
Ou nada sei...*

*(Almir Sater)*



## RESUMO

Os óleos essenciais (OE) são misturas complexas de substâncias aromáticas voláteis, lipofílicas, resultantes do metabolismo secundário das plantas. Aos OE têm sido atribuídas atividades biológicas, tais como antimicrobiana, antimutagênica, anticarcinogênica e antioxidante. A utilização dos OE representa uma abordagem interessante no controle de organismos patogênicos. A presença dos constituintes majoritários, carvacrol e timol, em OE é reconhecida como marcador de potencial antimicrobiano. Porém, o uso do carvacrol como agente antimicrobiano em produtos com ação germicida é limitado devido a sua elevada volatilidade e baixa solubilidade aquosa. A nanoencapsulação de OE e seus derivados constitui uma estratégia promissora para contornar as limitações de sua utilização na forma *in natura*. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar sistemas nanoemulsionados a base de carvacrol, visando a obtenção de um produto com atividade antimicrobiana. Nanoemulsões contendo carvacrol foram preparadas por duas variações da técnica de emulsificação espontânea: deslocamento do solvente e auto-nanoemulsificação (método livre de solvente orgânico). Para otimização das condições de preparação, três parâmetros foram avaliados: concentração de carvacrol, tipo e concentração de surfactante. Os sistemas nanoestruturados contendo carvacrol foram avaliados quanto a citotoxicidade e atividade antimicrobiana *in vitro*. O potencial desinfetante e/ou antisséptico foi determinado pelo método de diluição/neutralização conforme a Norma Europeia 1040:2005. Soluções alcoólicas de diferentes teores e géis a base do copolímero Aristoflex<sup>®</sup> AVC contendo carvacrol nanoemulsionado também foram desenvolvidos e avaliados quanto à atividade antimicrobiana. Ambas as técnicas de preparação produziram nanoemulsões monodispersas (PDI < 0,25) com tamanho de partícula médio entre 145 e 315 nm e elevados valores de potencial zeta (acima de -34,1 mV). As formulações permaneceram estáveis por até 90 dias de armazenamento sob diferentes condições de temperatura (8 e 25°C). A nanoemulsão de carvacrol (NC) apresentou concentração inibitória capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% (IC<sub>50</sub>) de 16,12 e 18,78 µg/mL, após 24 e 48 h de incubação em linhagem de fibroblastos 3T3, respectivamente. A concentração inibitória mínima (CIM) da NC contra cepas padrão de *S. aureus*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa* foi de 125, 250 e 500 µg/mL, respectivamente. A NC apresentou ação desinfetante e antisséptica na concentração de 0,8% contra cepas de *P. aeruginosa* e *S. aureus* após 5

e 30 min de contato, respectivamente. A associação do etanol à NC demonstrou-se viável, porém não resultou em aumento da atividade antimicrobiana frente as cepas bacterianas avaliadas. O gel contendo carvacrol nanoemulsionado (GNC) apresentou maior ação antimicrobiana contra cepas de *S. aureus* quando comparado ao *S. typhimurium*, independente da concentração ou do tempo de incubação testados. A atividade antimicrobiana do GNC frente a *S. aureus* foi igual ou superior àquela observada para o hipoclorito de sódio 1%, porém, não houve atividade antimicrobiana sobre *P. aeruginosa nos tempos testados*. O monitoramento da estabilidade das formulações semissólidas contendo carvacrol demonstrou que a nanoencapsulação protege o ativo contra processos de degradação, aumentando tanto a estabilidade do ativo como do produto final. Assim, os resultados obtidos indicam que os sistemas nanoestruturados desenvolvidos representam uma nova estratégia para a liberação do carvacrol, sendo uma alternativa promissora ao desenvolvimento de produtos com finalidade antimicrobiana e desinfetante.

**Palavras-chave:** óleos essenciais, carvacrol, nanotecnologia, nanoemulsão, géis, atividade antimicrobiana, potencial desinfetante.

## ABSTRACT

Essential oils (OE) are a combination of lipophilic volatile aromatics generated through the plants secondary metabolism. To the OE, it is often attributed biological activities such as antimicrobial, antimutagenic, anticarcinogenic and antioxidant. The use of OE may represent an interesting strategy in controlling pathogens. The presence of the major elements carvacrol and thymol is acknowledged as antimicrobial potential marker. However, the use of carvacrol as antimicrobial agent in germicidal action products is quite limited due to its high volatility and low water solubility resulting in restriction of use. The nanoencapsulation of OE and its derivatives with antimicrobial activity arises as a promising approach to overcome its uses limitations on *in natura* manners. In this context, the objective of this work is to develop and evaluate nanoemulsified systems based on carvacrol, aiming at obtaining a product with antimicrobial activity. Nanoemulsions were developed using carvacrol through two variations of the spontaneous nanoemulsification method (solvent displacement and organic solvent free/self-nanoemulsification). In order to optimize the preparation conditions, three parameters were evaluated: carvacrol concentration, type and concentration of surfactant. The nanostructured systems containing carvacrol were evaluated for cytotoxicity and antimicrobial activity *in vitro*. The disinfectant and/or antiseptic potential were determined by the dilution/neutralization method according to European Standard 1040:2005. Ethanolic solutions and gels based on Aristoflex<sup>®</sup> AVC copolymer containing nanoemulsified carvacrol were also elaborated and assessed for antimicrobial activity. Both preparation techniques produced monodisperse nanoemulsions (PDI <0.25) with average particle size between 145 and 315 nm and high values of zeta potential (above -34,1 mV). The formulations remained stable for up to 90 days of storage under different temperature conditions (8 e 25°C). The carvacrol nanoemulsion (NC) presented inhibitory concentration capable of reducing cell viability by 50% (IC<sub>50</sub>) of 16,12 and 18,78 µg/mL after incubation of 24 and 48 hours, respectively, in 3T3 fibroblast lineage. The minimum inhibitory concentration (CIM) of NC against standard strains of *S. aureus*, *S. typhimurium* and *P. aeruginosa* was 125, 250 and 500 µg/mL, respectively. The NC showed disinfectant and antiseptic action at 0.8% concentration against strains of *P. aeruginosa* and *S. aureus* after 5 and 30 min of contact, respectively. The association of ethanol with NC was viable, but did not result in an increase in antimicrobial activity against

the bacterial strains evaluated. The gel containing nanoemulsified carvacrol (GNC) had a higher antimicrobial action against strains of *S. aureus* when compared to *S. typhimurium*, independent of the concentration or incubation time tested. The antimicrobial activity of GNC against *S. aureus* was equal to or greater than that observed for 1% sodium hypochlorite. No antimicrobial GNC activity was observed on *P. aeruginosa*. Monitoring the stability of the semi-solid formulations containing carvacrol has demonstrated that nanoencapsulation protects the active against degradation processes, increasing both the stability of the active and the final product. Therefore, the results demonstrate the developed nanostructured systems represent a new strategy to carvacrol release process, appearing as a promising alternative to development of antimicrobial and disinfectant products.

**Keywords:** essential oils, carvacrol, nanotechnology, nanoemulsion, antimicrobial activity, potential disinfectant.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração esquemática dos tipos de nanopartículas utilizados à encapsulação de OE antimicrobianos: <b>a)</b> lipossomas; <b>b)</b> nanopartículas lipídicas sólidas; <b>c)</b> nanoesferas poliméricas; <b>d)</b> nanocápsulas poliméricas; <b>e)</b> nanoemulsões. ....	60
Figura 2 - Representação esquemática dos tipos de nanoemulsões, conforme composição da interface: <b>(A)</b> apenas fosfolipídeos como tensoativos; <b>(B)</b> fosfolipídeos adicionados de um tensoativo não iônico; <b>(C)</b> fosfolipídeos adicionados de tensoativos iônicos (aniônico ou catiônico) e <b>(D)</b> polímeros hidrofílicos.....	65
Figura 3 - Representação gráfica dos fenômenos de instabilidade física de emulsões: <b>(A)</b> cremação, <b>(B)</b> sedimentação, <b>(C)</b> floculação, <b>(D)</b> coalescência e <b>(E)</b> efeito de Ostwald. ....	72
Figura 4 - Estrutura química do carvacrol. ....	75
Figura 5 - Distribuição do tamanho de nanopartículas, determinada por espalhamento de luz dinâmico, para as formulações F5, F6 e F9. ....	118
Figura 6 - Distribuição do tamanho de populações de nanopartículas, determinada por espalhamento de luz dinâmico, para as formulações FA e FB. ....	122
Figura 7 - Valores médios de tamanho de partícula das formulações F5, F6 e F9, no período de 120 dias de armazenamento: <b>(A)</b> à 8°C e <b>(B)</b> à 25°C. Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento por formulação. Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as temperaturas de armazenamento para uma mesma formulação. Números distintos representam diferenças significativas entre formulações para o mesmo tempo e temperatura de armazenamento (p < 0,05; ANOVA única via seguida do teste de Bonferroni). Asteriscos indicam a ocorrência de mais de uma população de partícula. ....	124
Figura 8 - Valores médios de PDI (Índice de Polidispersão) das formulações F5, F6 e F9, no período de até 120 dias de armazenamento: <b>(A)</b> à 8°C e <b>(B)</b> à 25°C. Dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento por formulação. Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as temperaturas de armazenamento para uma mesma formulação. Números distintos representam diferenças significativas entre formulações para o mesmo tempo e temperatura de armazenamento (p < 0,05; ANOVA única via seguida do teste de Bonferroni). ....	126

Figura 9 - Valores médios de potencial zeta das formulações F5, F6 e F9, no período de 120 dias de armazenamento: (A) à 8°C e (B) à 25°C. Dados apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento por formulação. Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as temperaturas de armazenamento para uma mesma formulação. Números distintos representam diferenças significativas entre formulações para o mesmo tempo e temperatura de armazenamento (p < 0,05; ANOVA única via seguida do teste de Bonferroni). ..... 128

Figura 10 - Valores médios de pH das formulações F5, F6 e F9 no período de 120 dias de armazenamento: (A) à 8°C e (B) à 25°C. Dados apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento por formulação. Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as temperaturas de armazenamento para uma mesma formulação. Números distintos representam diferenças significativas entre formulações para o mesmo tempo e temperatura de armazenamento (p < 0,05; ANOVA única via seguida do teste de Bonferroni)..... 130

Figura 11 - Detalhe do aspecto homogêneo e coloração branca leitosa da nanoemulsão FA durante o estudo de estabilidade. .... 131

Figura 12 - Propriedades físico-químicas (tamanho de partícula, PDI, potencial zeta e pH) da nanoemulsão FA, no período de 120 dias de armazenamento à 8°C ou à 25°C. Dados apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento por formulação. Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as temperaturas de armazenamento para uma mesma formulação (p < 0,05; ANOVA única via seguida do teste de Tukey). ..... 132

Figura 13 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão da nanoemulsão de carvacrol (NC): aumento de 30.000x (A) e 60.000x (B). ..... 134

Figura 14 - Representação esquemática das nanopartículas de carvacrol formadas por auto-nanoemulsificação. .... 136

Figura 15 - Microscopia ótica de solução de carvacrol em DMSO. Aumento de 400x e tempo de exposição de 2 segundos. .... 137

Figura 16 - Viabilidade (%) de fibroblastos 3T3 após exposição de 24 h (A) e 48 h (B) ao carvacrol livre, à nanoemulsão de carvacrol (NC) e à nanoemulsão livre de ativo, determinada via ensaio de MTT. Resultados

apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre o controle (100% de viabilidade celular) e as concentrações testadas para um mesmo tratamento e tempo de exposição. Letras maiúsculas distintas representam diferença entre os tempos de exposição para um mesmo tratamento e concentração. Números distintos representam diferenças significativas entre os tratamentos para mesma concentração e tempo de exposição (p < 0,05; ANOVA única via, seguida do teste de Bonferroni).....	139
Figura 17 - Representação visual da concentração inibitória mínima (CIM) da nanoemulsão de carvacrol contra <i>Salmonella thyphimurium</i> (ATCC 14028), revelada com o uso de resazurina.....	146
Figura 18 - Logaritmo da redução da viabilidade (UFC/mL) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - ATCC 15442 ( <b>A</b> , <b>B</b> e <b>C</b> ) e de <i>Staphylococcus aureus</i> - ATCC 6538 ( <b>D</b> , <b>E</b> e <b>F</b> ), consoante aos tempos exposição à nanoemulsão de carvacrol (NC), ao carvacrol livre e ao hipoclorito de sódio. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). Asteriscos indicam diferenças significativas entre cepas bacterianas para um mesmo tratamento, concentração e tempo de exposição. Quadrados indicam diferenças significativas entre tratamentos para uma mesma concentração, tempo de exposição e bactéria. Losangos indicam diferenças significativas entre os tempos de um mesmo tratamento para mesma concentração e bactéria. Estrelas indicam diferenças significativas entre concentrações um mesmo tratamento para mesmo tempo de exposição e bactéria (p < 0,05; ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni).....	148
Figura 19 - Detalhe do aspecto visual do padrão de cor das formulações contendo carvacrol nanoemulsionado após a adição das soluções etanólicas.....	161
Figura 20 - Detalhes das colorações das soluções etanólicas contendo nanoemulsão de carvacrol, após 120 de estocagem à 25°C.....	163
Figura 21 - Propriedades físico-químicas das formulações Et. 10% + NC e Et. 20% + NC, armazenadas à temperatura ambiente por um período de 120 dias. (A) tamanho de partícula; (B) índice de polidispersão - PDI; (C) potencial zeta e (D) pH. ....	164
Figura 22 - Distribuição do tamanho de partícula das formulações (—) Sol. Et. 10% + NC e (---) Sol. Et. 20% + NC, após 120 dias de armazenamento à 25°C.....	165
Figura 23 - Densidade relativa dos géis à 25°C. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). As letras minúsculas distintas	

indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ; ANOVA via única seguida do pós-teste Bonferroni).....	178
Figura 24 - Curvas de viscosidade dos géis desenvolvidos: <b>(A)</b> géis de carvacrol livre, com ou sem adição de etanol e <b>(B)</b> géis de carvacrol livre e os géis de nanoemulsão de carvacrol contendo mesmos teores de etanol. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão ( $n = 3$ ). .....	180
Figura 25 - Reograma das formulações semissólidas desenvolvidas. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão ( $n = 3$ ).....	182
Figura 26 - Padrão de coloração dos géis após 60 dias de estocagem à 25°C. ....	185
Figura 27 - Potencial hidrogeniônico dos géis em estudo, armazenados ao longo de 60 dias, à 25°C. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão ( $n = 3$ ). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento para uma mesma formulação (ANOVA seguida do teste de Bonferroni, $p < 0,05$ ). .....	186
Figura 28 - Relação cepa bacteriana e diâmetro médio do halo de inibição (mm) para o gel de carvacrol, gel de nanoemulsão de carvacrol e hipoclorito de sódio. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão ( $n = 3$ ). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre bactérias para um mesmo tratamento, concentração e tempo. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre diferentes tratamentos para mesma concentração, tempo e bactéria. Algarismos distintos indicam diferenças significativas entre concentrações para um mesmo tratamento, tempo e bactéria ( $p < 0,05$ ; ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni). ....	188
Figura 29 - Detalhes dos halos de inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> : <b>(A)</b> após 24, 48 e 72 h de contato com o Gel de Carvacrol; <b>(B)</b> após 72 h de contato com o Gel de Nanoemulsão de Carvacrol. ....	191

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Resumo das estratégias nanotecnológicas empregadas à associação de carvacrol a sistemas nanoestruturados. ....	79
Quadro 2 - Caracterização físico-química das nanoemulsões de carvacrol quanto ao tamanho de partícula, PDI e potencial zeta. Variáveis da formulação: concentração de ativo (carvacrol) e tensoativo (poloxamer 188). Resultados apresentados como média $\pm$ padrão (n = 3). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre as concentrações de surfactante para a mesma concentração de ativo. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as concentrações de ativo para a mesma concentração de surfactante (p < 0,05; ANOVA via única seguida do pós teste Bonferroni). ....	115
Quadro 3 - Identificação e composição dos géis desenvolvidos após a incorporação do copolímero Aristoflex <sup>®</sup> AVC. ....	173
Quadro 4 - Características organolépticas das formulações semissólidas desenvolvidas durante o estudo de estabilidade. Observação do aspecto visual, cor e odor após 1 e 60 dias de armazenamento, à temperatura ambiente. ....	183



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades biológicas do carvacrol. ....	76
Tabela 2 - Classificação química de desinfetantes e antissépticos disponíveis comercialmente. ....	88
Tabela 3 - Composição das nanoemulsões preparadas pela técnica de emulsificação espontânea - difusão do solvente.....	105
Tabela 4 - Composição das nanoemulsões preparadas pela técnica de emulsificação espontânea - livre de solvente. ....	106
Tabela 5 - Concentrações de carvacrol, nanoemulsão de carvacrol e de hipoclorito de sódio comercial submetidas ao teste de suspensão quantitativo, para avaliação da atividade bactericida de desinfetantes químicos e antissépticos (fase 1) da EN 1040:2005 do CEN. ....	114
Tabela 6 - Caracterização físico-química das nanoemulsões quanto ao tamanho médio de partícula, PDI e potencial zeta. Variável da formulação: tipo de tensoativo (% , m/v). Resultados apresentados como média ± desvio padrão (n = 2). Letras minúsculas distintas, em uma mesma coluna, representam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05; ANOVA via única seguida do teste <i>t-student</i> ).120	
Tabela 7 - Teor (mg/mL) e eficiência de encapsulação - EE (%) do carvacrol nas suspensões coloidais. Resultados apresentados como média ± desvio padrão (DP <sup>*</sup> ), n = 3. ....	135
Tabela 8 - Valores de IC <sub>50</sub> da nanoemulsão de carvacrol e de carvacrol livre para viabilidade de fibroblastos 3T3, após 24 h e 48 h de exposição. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (SEM), de três experimentos independentes. Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tempos de exposição para mesmo tratamento. Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos para mesmo tempo de exposição (p < 0,05, ANOVA única via). ....	140
Tabela 9 - Diâmetro médio (mm) dos halos de inibição das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442) e <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028) frente a antibióticos. Resultados apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). ....	142
Tabela 10 - Concentração inibitória mínima (CIM) da nanoemulsão de carvacrol e do carvacrol livre, frente à cepa padrão de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538), <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442), determinada pelo método de microdiluição em caldo. ....	143
Tabela 11 - Identificação e composição das formulações resultantes da associação da solução etanólica à nanoemulsão de carvacrol. ....	159

Tabela 12 - Caracterização físico-química das soluções etanólicas contendo nanoemulsão de carvacrol quanto ao tamanho de partícula, índice de polispersão (PDI) e potencial zeta (PZ). Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas distintas em uma mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA única via seguida do teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

..... 162  
Tabela 13 - Concentração inibitória mínima (CIM) da nanoemulsão de carvacrol (NC) e das formulações Sol. Et. 10% + NC e Sol. Et. 20% + NC determinada pelo método de microdiluição em caldo. .... 166

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O - Água em Óleo

AG - Álcool Gel

ANOVA - análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATP - adenosina tri-fosfato

BCRJ - Banco de Células do Rio de Janeiro

BHI - *Brain Heart Infusion*

Br-CAST- *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

BSAC - *British Society for Antimicrobial Chemotherapy*

C 100% - Controle de 100% de crescimento do inóculo (meio de cultivo contendo inóculo tratado com nanoemulsão branca)

C Est. - Controle de esterilidade do meio e do ensaio

C Neg. - Controle negativo (meio de cultivo contendo nanoemulsão de carvacrol)

CCD - Cromatografia de Camada Delgada

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CEN - Comitê Europeu de Normatização

CG - Cromatografia Gasosa

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CL<sub>50</sub> - Concentração Letal média

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLN - Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMB - Concentração Mínima Bactericida

Conc. - Concentração de ativo em µg/mL

cP - *centiPoise*

d - densidade

DLS - *Dynamic Light Scattering*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - *deoxyribonucleic acid*

DP - Desvio Padrão

DPR - Desvio Padrão Relativo

DU - Diluição de Uso

e.g. - do latim *exempli gratia* traduzida como “por exemplo”

EE - Eficiência de Encapsulação

EHL - Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo  
EN - Norma Européia  
EPA - *Environmental Protection Agency*  
EUA - Estados Unidos da América  
EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*  
ex. - exemplo  
F - Formulação  
FIOCRUZ - Fundação Instituto Oswaldo Cruz  
g - grama  
G-Sol. Et. 10% + NC - Gel de Solução Etanólica 10% + Nanoemulsão de Carvacrol  
G-Sol. Et. 20% + NC - Gel de Solução Etanólica 20% + Nanoemulsão de Carvacrol  
GB - Gel Base  
GC - Gel de Carvacrol  
GNC - Gel de Nanoemulsão de Carvacrol  
h - hora  
HI - Halo de Inibição  
i.e. - do latim *id est*, traduzida como “isto é” ou ainda “ou seja”  
IC<sub>50</sub> - concentração inibitória capaz de reduzir 50%  
ICH - *International Conference on Harmonisation*  
ICM - Inibição do Crescimento Microbiano  
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
ISO - *International Organization for Standardization*  
IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*  
L - Litro  
LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública  
LAMUF - Laboratório Municipal de Saúde Pública  
LCME - Laboratório Central de Microscopia Eletrônica  
LD - Limite de Detecção  
*log* - logaritmo  
LQ - Limite de Quantificação  
m/m - porcentagem massa/massa  
m/v - porcentagem massa/volume  
MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão  
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura  
MFA - Microscopia de Força Atômica  
mg - miligrama  
MH - Müeller Hinton  
min - minutos

mL - mililitro  
mM - micromolar  
mm - milímetro  
MS - Ministério da Saúde  
MTT - brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio  
mV - millivolt  
N - suspensão bacteriana inicial  
n.d. - não determinado  
N<sub>2</sub> - nitrogênio  
Na - mistura teste  
NaCl - Cloreto de Sódio  
NaHCO<sub>3</sub> - carbonato ácido de sódio  
NC - Nanoemulsão de Carvacrol  
NC<sub>0</sub> - Nanoemulsão de Carvacrol sem etanol  
NLS - Nanopartículas Lipídicas Sólidas  
nm - nanômetro  
Nv - Suspensão de validação  
O/A - Óleo em Água  
°C - graus Celsius  
OE - Óleos Essenciais  
OECD - *Organisation for Economic Co-operation and Development*  
p - probabilidade de significância  
p/p - porcentagem peso/peso  
p/v - porcentagem peso/volume  
PCL - policaprolactona  
PCS - *Photon Correlation Spectroscopy*  
PDI - *Polydispersity Index*  
pH - potencial Hidrogeniônico  
PHB - polihidroxibutirato  
PIT - *Phase Inversion Temperature*  
PLA - poli (ácido láctico)  
PLGA - ácido láctico-co-glicólico  
PMF - Prefeitura Municipal de Florianópolis  
psi - *pound force per square inch*  
PZ - Potencial Zeta  
q.s.p. - quantidade suficiente para  
R - Recuperação  
R<sup>2</sup> - coeficiente de correlação  
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada  
RL - Redução Logarítmica

RNA - *ribonucleic acid*

rpm - rotação por minuto

S - Sensível

SBF - Soro Bovino Fetal

SC - Santa Catarina

SCENIHR - *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*

SEM - erro padrão da média

SMS - Secretária Municipal de Florianópolis

Sol. Et. - Solução Etanólica

T - Tempo

TSA - Ágar Triptona de Soja

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

UI - Unidades Internacionais

UV-Vis - Ultravioleta Visível

XTT - 2, 3 - bis {2 - metoxi - 4 - nitro - 5 - [(sulfenilamino) carbonil] -

2H - hidróxido de tetrazólio }

µg - micrograma

µL - microlitro

µm - micrômetro

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\lambda$  - comprimento de onda

® - marca registrada

~ - aproximadamente

% - percentual / porcentagem

$\leq$  - menor ou igual

$\geq$  - maior ou igual

$<$  - menor

$>$  - maior

$\delta$  - desvio padrão (DP) do intercepto da curva com o eixo Y da linha de regressão



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>41</b>
<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>41</b>
<b>HIPÓTESE DO ESTUDO .....</b>	<b>43</b>
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>47</b>
1 OS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	49
<b>1.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.....</b>	<b>51</b>
<b>1.2 Métodos <i>in vitro</i> para avaliação da atividade antimicrobiana de produtos naturais .....</b>	<b>53</b>
2 NANOENCAPSULAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS.....	58
<b>2.1 Nanoemulsões .....</b>	<b>61</b>
2.1.1 Composição das nanoemulsões .....	63
2.1.2 Técnicas de preparação das nanoemulsões.....	65
2.1.3 Caracterização das propriedades físico-químicas das nanoemulsões .....	69
2.1.3.1 <i>Diâmetro de gotícula e índice de polidispersão.....</i>	<i>69</i>
2.1.3.2. <i>Potencial zeta .....</i>	<i>70</i>
2.1.3.3 <i>pH.....</i>	<i>70</i>
2.1.3.4 <i>Morfologia.....</i>	<i>71</i>
2.1.4 Estudo de estabilidade das nanoemulsões .....	71
3 CARVACROL .....	74
<b>3.1 Atividade antimicrobiana do carvacrol.....</b>	<b>76</b>
<b>3.2 Associação de carvacrol a sistemas nanoestruturados.....</b>	<b>78</b>
4 ANTISSÉPTICOS E DESINFETANTES.....	85
<b>4.1 Métodos para avaliação da ação desinfetante.....</b>	<b>92</b>

4.1.1 Método da Diluição de Uso .....	92
4.1.2 Método da neutralização .....	93
<b>CAPÍTULO 2: NANOEMULSÕES DE CARVACROL .....</b>	<b>97</b>
<b>1 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>103</b>
<b>1.1 Material.....</b>	<b>103</b>
<b>1.2 Métodos.....</b>	<b>104</b>
1.2.1 Preparação das nanoemulsões de carvacrol .....	104
1.2.1.1 <i>Técnica de emulsificação espontânea - difusão do solvente...</i>	104
1.2.1.2 <i>Técnica de emulsificação espontânea livre de solvente (auto-nanoemulsificação).....</i>	105
1.2.2 Caracterização das nanoemulsões de carvacrol .....	106
1.2.2.1 <i>Determinação do tamanho de partícula e índice de polidispersão .....</i>	106
1.2.2.2 <i>Determinação do potencial zeta.....</i>	106
1.2.2.3 <i>Determinação do pH.....</i>	106
1.2.2.4 <i>Avaliação morfológica da nanoemulsão de carvacrol preparada pela técnica de emulsificação espontânea livre de solvente (auto-nanoemulsificação).....</i>	107
1.2.2.5 <i>Determinação do teor e da eficiência de encapsulação do ativo .....</i>	107
1.2.3 Avaliação da estabilidade das nanoemulsões de carvacrol .....	108
1.2.4 Estudo da toxicidade <i>in vitro</i> .....	108
1.2.4.1 <i>Linhagem de fibroblastos murino .....</i>	108
1.2.4.2 <i>Determinação da viabilidade celular pelo método colorimétrico do MTT.....</i>	109
1.2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	110
1.2.5.1 <i>Determinação da concentração inibitória mínima .....</i>	110
1.2.5.1.1 <i>Os Isolados.....</i>	110
1.2.5.1.2 <i>Método de microdiluição em caldo.....</i>	110
1.2.6 Teste da avaliação da atividade desinfetante.....	112
1.2.6.1 <i>Os isolados.....</i>	112
1.2.6.2 <i>Controles de validação do método de diluição/neutralização</i>	113
1.2.6.3 <i>Método de diluição/neutralização.....</i>	113
<b>2 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>115</b>

<b>2.1 Estudo de formulação .....</b>	<b>115</b>
2.1.1 Nanoemulsões de carvacrol preparadas pela técnica de emulsificação espontânea - difusão do solvente.....	115
2.1.2 Nanoemulsões de carvacrol preparadas pela técnica de emulsificação espontânea livre de solvente (auto-nanoemulsificação).....	120
<b>2.2 Avaliação da estabilidade .....</b>	<b>123</b>
2.2.1 Nanoemulsões de carvacrol obtidas pela técnica de emulsificação espontânea - difusão do solvente.....	123
2.2.2 Nanoemulsões de carvacrol preparadas pela técnica de emulsificação espontânea livre de solvente (auto-nanoemulsificação).....	131
<b>2.3 Avaliação morfológica da nanoemulsão de carvacrol.....</b>	<b>133</b>
<b>2.4 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação do ativo .....</b>	<b>134</b>
<b>2.5 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> .....</b>	<b>136</b>
<b>2.6 Determinação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> .....</b>	<b>142</b>
2.6.1 Avaliação da sensibilidade das cepas frente a antibióticos .....	142
2.6.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	143
<b>2.7 Avaliação do potencial desinfetante da nanoemulsão de carvacrol.....</b>	<b>147</b>
2.7.1 Validação do método de diluição/neutralização.....	147
2.7.2 Método de diluição/neutralização .....	148
<b>CAPÍTULO 3: SOLUÇÕES ETANÓLICAS CONTENDO NANOEMULSÃO DE CARVACROL .....</b>	<b>155</b>
<b>1 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>158</b>
<b>1.1 Material.....</b>	<b>158</b>
<b>1.2 Métodos .....</b>	<b>158</b>
1.2.1 Preparação das soluções etanólicas contendo nanoemulsão de carvacrol (NC).....	158
1.2.2 Caracterização das formulações .....	160
1.2.3 Avaliação da estabilidade das formulações.....	160

1.2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	160
<b>1.3 Análise Estatística .....</b>	<b>160</b>
<b>2 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>161</b>
<b>2.1 Caracterização das soluções etanólicas contendo nanoemulsão de carvacrol .....</b>	<b>161</b>
<b>2.2 Avaliação da estabilidade .....</b>	<b>163</b>
<b>2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> .....</b>	<b>166</b>
<b>CAPÍTULO 4: GÉIS CONTENDO CARVACROL NANOEMULSIONADO .....</b>	<b>169</b>
<b>1 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>172</b>
<b>1.1 Material.....</b>	<b>172</b>
<b>1.2 Métodos.....</b>	<b>173</b>
1.2.1 Preparação de géis contendo nanoemulsão de carvacrol.....	173
1.2.2 Caracterização das formulações semissólidas.....	175
1.2.2.1 Determinação da densidade.....	175
1.2.2.2 Determinação da viscosidade .....	175
1.2.3 Avaliação da estabilidade das formulações semissólidas.....	175
1.2.4 Determinação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> pelo método de difusão em ágar pela técnica de poços .....	176
<b>1.3 Análise Estatística .....</b>	<b>177</b>
<b>2 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>177</b>
<b>2.1 Caracterização das formulações semissólidas .....</b>	<b>177</b>
2.1.1 Determinação da densidade .....	178
2.1.2 Determinação da viscosidade.....	179
<b>2.2 Avaliação da estabilidade .....</b>	<b>183</b>
2.2.1 Monitoramento das propriedades organolépticas.....	183
2.2.2 Determinação do pH .....	186
<b>2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> .....</b>	<b>187</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>193</b>

**REFERÊNCIAS ..... 197**

**APÊNDICE A – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE  
MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE CARVACROL EM NANOPARTÍCULAS  
..... 227**



## **INTRODUÇÃO**

---



Os óleos essenciais (OE) e seus componentes têm uma ampla aplicação em medicina popular, indústrias de sabor, aromas e preservação de alimentos, porém, somente nos últimos anos seu potencial antimicrobiano vem sendo reconhecido (NOSTRO; PAPALIA, 2012). Os OE são misturas complexas de substâncias aromáticas voláteis, lipofílicas, geralmente líquidas, resultantes do metabolismo secundário das plantas (GARCÍA-SALINAS et al., 2018; ARAÚJO et al., 2015; BILIA et al., 2014). São também conhecidos como óleos etéreos ou, simplesmente, essências (SARTO; ZANUZZO JUNIOR 2014; SIMÕES; SPITZER, 2004).

Nos últimos anos, os OE têm atraído interesse como uma abordagem alternativa na medicina tradicional pela diversidade de atividades biológicas e.g., antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, antifúngica, antimutagênica, anticarcinogênica e anti-espasmódica. Na literatura, diversos estudos *in vitro* confirmam a potencial aplicação dos OE, conforme reportados por estudos etnofarmacológicos (GARCÍA-SALINAS et al., 2018; MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018). A utilização dos OE em produtos com ação antimicrobiana pode representar uma abordagem interessante no controle e propagação de organismos patogênicos (OUAZZOU et al., 2012). Entende-se por agentes ou produtos antimicrobianos substâncias químicas que destroem ou inibem o crescimento de microrganismos na forma vegetativa, nos diferentes locais onde podem ser encontrados, i.e., tecidos vivos ou superfícies inanimadas (ANDRADE; ARAGÃO; FURLAN, 2009).

A presença de carvacrol e timol, de forma isolada ou em combinação, como componentes majoritários do óleo essencial de *Origanum vulgare*, é reconhecida como marcador de potencial antimicrobiano (OUAZZOU et al., 2012). Estudos realizados com OE e carvacrol têm atribuído a atividade antibacteriana deste monoterpeneo ao seu efeito sobre as propriedades estruturais e funcionais da membrana citoplasmática (MARYAM et al., 2015; NOSTRO; PAPALIA, 2012; OUAZZOU et al., 2012; CRISTANI et al., 2007). O carvacrol, também conhecido como iso-timol, é um fenol isoprenílico monoterpênico cíclico com odor característico do orégano (*Origanum vulgare*). Ocorre em plantas aromáticas da família Lamiaceae (Labiatae), incluindo os gêneros *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra*, *Thymus*, *Corydothymus* e *Lippia*, esta última da família Verbenaceae (PUBCHEM, 2017; KAMIMURA et al., 2014; NOSTRO; PAPALIA, 2012; ÖZKAN; ERDOĞAN, 2011; BASER, 2008). Entretanto, a natureza hidrofóbica e a volatilidade do carvacrol bem como sua suscetibilidade a oxidação mediada pela luz ou pelo calor, limitam seu uso como agente

antimicrobiano em produtos com ação germicida (LIU et al., 2018; SÃO PEDRO et al., 2013).

A nanoencapsulação de compostos bioativos naturais com atividade antimicrobiana, tem se mostrado uma abordagem interessante para contornar as limitações relacionadas às propriedades físico-químicas de uso na forma *in natura* (BARANAUSKAITE et al., 2018; MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018; KOTRONIA et al., 2017; SÃO PEDRO et al., 2013). A nanoencapsulação de compostos bioativos permite modular a liberação dos componentes ativos; aumentar a estabilidade física por proporcionar uma barreira protetora contra processos de degradação; diminuir a volatilização e, ainda, por melhorar a solubilidade e aumentar a disponibilidade e a eficácia nos sítios de ação de interesse (BARANAUSKAITE et al., 2018; MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018; KOTRONIA et al., 2017; BAJERSKI et al., 2016; KAMIMURA et al., 2014, BILIA, et al., 2010). Bilia et al. (2014) e São Pedro et al. (2013), sugerem que a ação de ativos antimicrobianos é potencializada pela nanoencapsulação devido ao tamanho reduzido das nanopartículas que, por sua vez, têm uma tensão superficial elevada, lhes permitindo fundir-se à membrana de células procarióticas.

Frente ao exposto, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver nanoemulsões a base de carvacrol, visando sua aplicação como produto antimicrobiano. Para melhor compreensão, este trabalho foi dividido em quatro capítulos: (1) Revisão da literatura, (2) Nanoemulsões de carvacrol, (3) Soluções etanólicas contendo nanoemulsão de carvacrol, e (4) Géis contendo carvacrol nanoemulsionado, além das considerações finais.

## **OBJETIVOS**

---



## Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar sistemas nanoemulsionados a base de carvacrol, visando a obtenção de um produto com atividade antimicrobiana.

## Objetivos Específicos

- Preparar nanoemulsões a base de carvacrol pela técnica de emulsificação espontânea;
- Caracterizar as nanoemulsões quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta, pH, morfologia, teor de ativo e eficiência de encapsulação;
- Avaliar e comparar a estabilidade física das nanoemulsões desenvolvidas durante o armazenamento em diferentes temperaturas;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do ativo livre e da nanoemulsão contendo carvacrol em cultura de fibroblastos murino Balb/c 3T3;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do ativo livre e nanoencapsulado em cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- Avaliar o potencial desinfetante e/ou antisséptico do carvacrol livre e nanoencapsulado;
- Preparar soluções etanólicas contendo carvacrol nanoemulsionado;
- Caracterizar as soluções etanólicas contendo carvacrol nanoemulsionado quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta e pH;
- Avaliar e comparar a estabilidade física das soluções etanólicas contendo nanoemulsão de carvacrol armazenadas à temperatura ambiente;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* das soluções etanólicas contendo carvacrol nanoemulsionado;

- Desenvolver formulações semissólidas contendo nanoemulsão de carvacrol, com e sem etanol;
- Caracterizar as formulações semissólidas desenvolvidas quanto à morfologia, densidade e viscosidade;
- Avaliar e comparar a estabilidade física das formulações semissólidas durante armazenamento à temperatura ambiente;
- Avaliar e comparar a atividade antimicrobiana *in vitro* das formulações contendo carvacrol nanoemulsionado e livre.

## **HIPÓTESE DO ESTUDO**

---



O sistema contendo carvacrol nanoemulsionado apresenta atividade antimicrobiana para aplicação como produto desinfetante.



## **CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA**

---



## 1 OS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais (OE) são misturas complexas de substâncias aromáticas voláteis, lipofílicas, geralmente líquidas, raramente coloridas, com uma densidade geralmente inferior à água (PRAKASH et al., 2018; MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018; GARCÍA-SALINAS et al., 2018; SHARIFI-RAD et al., 2018; RYU et al., 2018; ARAÚJO et al., 2015; BILIA et al., 2014; MILLEZI et al., 2012; SIMÕES; SPITZER, 2004). Os OE são também conhecidos como óleos etéreos ou, simplesmente, essências (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; SARTO; ZANUZZO JUNIOR 2014; SIMÕES; SPITZER, 2004). Essas denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas como, por exemplo, a designação de “óleo” é devido a, geralmente, serem líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente. Entretanto, a principal característica é a volatilidade, diferenciando-os dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas obtidas normalmente de sementes. Os óleos voláteis apresentam solubilidade limitada em água, sendo solúveis em solventes orgânicos apolares como o éter e recebendo, por isso, a denominação de óleos etéreos (BILIA et al., 2014; SIMÕES; SPITZER, 2004). Os OE podem ser sintetizados por todos os órgãos das plantas e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (ARAÚJO et al., 2015; SÃO PEDRO et al., 2103; BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; SIMÕES; SPITZER, 2004).

Conforme definido pela Organização Internacional de Normalização (ISO, do inglês *International Organization for Standardization*), o termo óleo essencial é reservado a produtos obtidos a partir de matérias primas vegetais por destilação com água ou vapor de água, ou a partir da prensagem do epicarpo de frutas cítricas, ou por destilação, ou seja, apenas por meios físicos (BILIA et al., 2014).

Dentre os compostos gerados no metabolismo, os metabólitos primários são aqueles essenciais à vida e comuns aos seres vivos, e.g., ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e carboidratos. Entretanto os vegetais, apresentam um arsenal metabólico (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de transformar e acumular inúmeras outras substâncias não necessariamente relacionadas diretamente à manutenção da vida. Os produtos deste complexo conjunto metabólico são denominados de metabólitos secundários e embora não sejam essenciais à manutenção da vida do vegetal, garantem vantagens para sua sobrevivência e a perpetuação da espécie. Metabólitos secundários desempenham ação

protetora em relação às mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição aos raios ultravioleta e deficiência de nutrientes minerais (POSER; MENTZ, 2004). Tendo em conta a atração de determinados insetos aos odores característicos dos OE, estes são considerados facilitadores do processo reprodutivo das plantas, uma vez que, os insetos propiciam a dispersão de pólen e sementes. Além disso, os OE protegem o organismo de plantas de microrganismos patogênicos, repelem insetos que atuam como vetores de doenças e, ainda, por conferirem à planta gosto desagradável podem reduzir o apetite de alguns herbívoros (ARAÚJO et al., 2015; SÃO PEDRO et al., 2013). Nesta lógica, os OE são produtos resultantes do metabolismo secundário das plantas (MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018; BILIA et al., 2014; SARTO; ZANUZZO JUNIOR 2014).

Geralmente, os OE contêm cerca de 20 a 60 componentes, embora mais de 100 compostos possam ser encontrados em diferentes concentrações (GARCÍA-SALINAS et al., 2018; NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; BILIA et al., 2014; SANTOS et al., 2011). Todavia, apenas dois ou três componentes são encontrados em concentrações elevadas (20 - 70%, m/m), sendo denominados compostos majoritários (GARCÍA-SALINAS et al., 2018; BILIA et al., 2014). Por exemplo, o carvacrol (30%) e o timol (27%) são os principais componentes do óleo essencial de *Origanum* spp. (BILIA et al., 2014). Os OE são uma mistura de compostos que incluem hidrocarbonetos terpênicos (principalmente monoterpenos e sesquiterpenos), derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, fenóis e óxidos) e substâncias contendo enxofre (GARCÍA-SALINAS et al., 2018; NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; BLANK et al., 2016; SARTO; ZANUSSO JUNIOR, 2014; SIMÕES; SPITZER, 2004).

Os terpenos constituem uma classe de metabólitos secundários vegetais, sendo esse termo utilizado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades de isoprenos (C<sub>5</sub>). Os esqueletos carbonados dos terpenos são formados pela condensação de um número variável de unidades isoprênicas (SIMÕES; SPITZER, 2004). Entre os terpenos, os monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos representam os principais constituintes dos OE, sendo os monoterpenos as moléculas mais representativas (constituindo 90% dos OE). Os monoterpenos são compostos por duas unidades C<sub>5</sub> ramificadas e insaturadas (isopreno), enquanto os sesquiterpenos são compostos por três unidades de isopreno (BILIA et al., 2014; SÃO PEDRO et al., 2013).

O extenso rol de atividades biológicas dos OE pode ser

relacionado à complexidade e variabilidade de sua composição química e, geralmente, são determinadas pelos seus componentes majoritários (BILIA et al., 2014; SÃO PEDRO et al., 2013). Tradicionalmente, uma série de atividades biológicas, tais como atividade antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, antifúngica, antimutagênica, anticarcinogênica e antiespasmódica têm sido atribuídas aos OE, de fato, estudos vêm confirmando essas potencialidades (MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018; PRAKASH et al., 2018; SHARIFIRAD et al., 2018; NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; MARYAM et al., 2015; BILIA et al., 2014; SARTO; ZANUZZO JUNIOR 2014; NOSTRO; PAPALIA, 2012; SCHERER et al., 2009). Dentre as aplicações mais recentes dos OE estão as atividades antioxidante e antimicrobiana, esta última explorada para fins de conservação de alimentos após incorporação dos óleos em embalagens (BILIA et al., 2014).

### **1.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais**

Os OE podem apresentar ação antimicrobiana por: (a) interferir na dupla camada fosfolipídica da membrana celular da bactéria, aumentando a permeabilidade e permitindo a perda dos constituintes celulares; (b) alterar sistemas enzimáticos envolvidos na produção de energia celular e na síntese de componentes estruturais e, (c) destruir o material genético (SARTO; ZANUSSO JUNIOR, 2014).

Dentre os componentes dos EO, fenóis e aldeídos apresentam maior potencial antibacteriano, seguidos por álcoois, cetonas, ésteres e finalmente hidrocarbonetos (MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018). Especificamente, a elevada hidrofobicidade, bem como a pequena extensão das cadeias carbônicas dos compostos fenólicos, permitem que o sítio de ação seja a membrana lipídica da célula microbiana. Esses compostos se acumulam na bicamada lipídica das membranas externa e mitocondrial, alterando sua estrutura e função e levando a sua ruptura com a morte do patógeno (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012; DEVI et al., 2010). Outra consequência relacionada à desestabilização da membrana citoplasmática é a perda de constituintes celulares pelo aumento da permeabilidade. Ao penetrarem na célula bacteriana, os OE e seus componentes majoritários, a exemplo do limoneno, carvacrol, timol, mentol, citral, geraniol e eugenol, podem, ainda, se ligar a proteínas específicas, exercendo atividade inibitória no citoplasma celular. A sua adesão ou intercalação no DNA ou RNA também é relatada (BASSOLÉ; JULIANI, 2012; VAN VUUREN; VILJOEN, 2011; SILVA et al., 2010).

A taxa de desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para aplicações clínicas diminuiu drasticamente durante os anos. Assim, compostos derivados de plantas naturais como os OE podem representar alternativas interessantes às moléculas sintéticas, devido ao grande potencial no tratamento de infecções (SHARIFI-RAD et al., 2018; BARANAUSKAITE et al., 2018). Nos últimos anos, diversos estudos sobre a utilização de OE como agentes antimicrobianos (e.g., bactérias, leveduras e fungos filamentosos) têm sido descritos na literatura, confirmado os relatos de estudos etnofarmacológicos (SÃO PEDRO et al., 2013). As folhas do limão-cravo (*Citrus limonia*) são utilizadas em infusões no combate de resfriados e coriza e o suco é utilizado na medicina alternativa para tratamento de problemas gastrointestinais e contra infecções bacterianas. *Satureja montana*, popularmente conhecida como segurelha de inverno ou segurelha montanhesa, na medicina tradicional e homeopática, é utilizada em enfermidades digestivas como cólica e diarreia. Millezi et al. (2013), após determinarem as concentrações inibitória mínimas (CIM) dos OE das espécies supracitadas demonstraram sua efetividade contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O *S. aureus* apresentou maior sensibilidade ao OE de *Citrus limonia* e a *E. coli* ao óleo de *S. montana*. Estes resultados *in vitro* sugerem o uso potencial destes OE como uma alternativa aos antimicrobianos.

A forte ação antimicrobiana do óleo de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) foi determinada pelo método da microdiluição em caldo, contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium perfringens*, sendo o eugenol o componente majoritário deste OE (SCHERER et al., 2009).

Andrade e colaboradores (2012), comprovaram a atividade antibacteriana dos OE de citronela (*Cymbopogon nardus*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e gengibre (*Zingiber officinale*) contra bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella cholerasuis*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*). Os OE contendo monoterpenos como constituintes majoritários, extraídos das folhas de hortelã pimenta (*Mentha piperita* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf), manjerona (*Origanum majorana* L.) e manjerição (*Ocimum basilicum* L.), foram efetivos na inibição do crescimento de cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica, *Salmonella enterica* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* e *Enterobacter sakazaki* (VALERIANO et al., 2012).

O OE de orégano (*O. vulgare*) apresentou atividade tóxica a

*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis* (ARAÚJO et al., 2015). Por sua vez, a multiplicação da *Salmonella enteritidis in vitro* foi inibida pelo OE de orégano oriundo de diferentes regiões (SILVA et al., 2010).

## **1.2 Métodos *in vitro* para avaliação da atividade antimicrobiana de produtos naturais**

O uso indiscriminado dos antibióticos e a pressão seletiva ambiental produzida por antissépticos, desinfetantes e conservantes tem gerado uma resposta de sobrevivência nos microrganismos (AVANCINI; BOTH, 2017). Esse contexto motiva a busca de novos compostos antimicrobianos (grupos antibióticos e compostos desinfetantes, por exemplo) onde as plantas medicinais se destacam sendo consideradas recursos sustentáveis, renováveis que podem ser usados em substituição ou em complementariedade aos produtos convencionais (MACIEL et al., 2017; AVANCINI; BOTH, 2017). Na corrida contra a resistência microbiana, os estudos *in vitro* são de extrema importância, sendo o primeiro *screening* à descoberta de novos compostos antimicrobianos mais eficazes, menos tóxicos e com menor impacto ambiental, comparativamente, aos ativos de uso corrente (AMPARO et al., 2018; MIRA DE BONA et al., 2014; OSTROSKY et al., 2008).

Os métodos de avaliação da atividade antimicrobiana são padronizados por normas estabelecidas por órgãos como o CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), o mais adotado internacionalmente. Além desse, também existem outros como: *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e, atualmente, o *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (Br-CAST) (AMPARO et al., 2018). Os métodos padronizados e descritos pelos órgãos normalizadores são desenvolvidos e utilizados na clínica para analisar agentes antimicrobianos convencionais, como os antibióticos que são, geralmente, hidrofílicos. Entretanto, os produtos naturais possuem características físico-químicas diferentes dos antibióticos, algumas vezes são voláteis, insolúveis em água e viscosos ou ainda substâncias complexas, dessa forma, feitas modificações esses métodos podem ser empregados na avaliação da atividade antimicrobiana de produtos de origem vegetal (AMPARO et al., 2018; MIRA DE BONA et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2007; HOOD; WILKINSON; CAVANAGH, 2003).

Há diversos métodos para determinar a atividade antibacteriana

de extratos, frações, óleos essenciais e substâncias isoladas de vegetais, incluindo avaliações qualitativas (triagens) e/ou quantitativas, com a determinação da menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano (Concentração Inibitória Mínima/CIM). Os principais métodos microbiológicos para avaliação da atividade antimicrobiana, tanto de bactérias como de fungos, podem ser classificados em três tipos: ensaios bioautográficos, de difusão e de diluição (AMPARO et al., 2018; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; MIRA DE BONA et al., 2014; SILVEIRA et al., 2009; OSTROSKY et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2007; HOOD; WILKINSON; CAVANAGH, 2003).

Em 1946, Goodall e Levi combinaram o método de cromatografia em papel com bioautografia de contato para detectar diferentes penicilinas. Posteriormente, em 1961, Fischer e Lautner introduziram a Cromatografia de Camada Delgada (CCD) (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Assim, os ensaios bioautográficos são aqueles que empregam placas de cromatografia de camada delgada (CCD) para a análise. Os compostos a serem separados por CCD são colocados em contato, de forma direta, indireta ou por imersão, com placas de ágar onde o microrganismo teste foi previamente inoculado (AMPARO et al., 2018; SILVEIRA et al., 2009). Zonas de inibição de crescimento microbiano indicam a presença de substâncias antimicrobianas. Tratam-se de métodos qualitativos, particularmente, importantes na pesquisa de compostos antimicrobianos vegetais, pois permitem a localização direta de constituintes ativos a partir de uma matriz complexa (SILVEIRA et al., 2009). Três técnicas bioautográficas foram descritas à investigação de compostos antimicrobianos: a difusão em ágar, bioautografia direta e ensaio de sobreposição de ágar (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

O teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placa, atualmente recomendado e padronizado pelo CLSI, foi desenvolvido em 1940 e se baseia no originalmente descrito por Bauer e colaboradores (1966) (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; OSTROSKY et al., 2008; ALVES et al., 2008). Os ensaios de difusão fundamentam-se na difusão da substância a ser ensaiada, em um meio de cultura sólido que contém o microrganismo desafiado. A substância a ser testada é colocada em contato com o meio de cultura previamente inoculado e, a maneira como se processa esse contato define os diferentes métodos de difusão, dentre eles, método de difusão em disco, método dos cilindros de aço inoxidável ou de vidro e método de perfuração de poços em ágar. Na técnica de perfuração de poços em

ágar, a remoção do meio de cultura sólido é realizada com auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é realizada a aplicação da substância analisada. Após a difusão, ocorre o aparecimento de um halo, denominado halo de inibição (HI) de crescimento do microrganismo. O tamanho do HI do crescimento do microrganismo desafiado é relacionado com a concentração da substância ensaiada. O diâmetro do HI de crescimento é medido partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de microrganismos (SILVEIRA et al., 2009; OSTROSKY et al., 2008). Como controle positivo, emprega-se um quimioterápico padrão e como controle negativo o solvente utilizado na solubilização da substância em ensaio. As temperaturas de incubação recomendadas ao crescimento bacteriano variam de 35 a 37°C, durante 24 a 48 horas (OSTROSKY et al., 2008). Tais condições são geralmente utilizadas para microrganismos de crescimento rápido e para alguns de crescimento fastidiosos (ALVES et al., 2008).

Os ensaios de difusão em ágar fornecem resultados qualitativos ao categorizar as bactérias como suscetíveis, intermediárias ou resistentes frente a substância testada. Além disso, os métodos de difusão em ágar não são apropriados para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), pois é impossível quantificar a quantidade de agente antimicrobiano difundido no meio (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Esse fato resulta de fatores que interferem na difusão dos compostos no meio de cultura, como espessura do ágar, padronização do inóculo, volume da substância teste aplicada e propriedades físico-químicas das amostras analisadas. A solubilidade é a principal característica de alguns extratos e dos óleos essenciais, que dificulta a total aplicação das normas do CLSI, padronização mais aceita e adotada internacionalmente (AMPARO et al., 2018). Além disso, a inibição do crescimento bacteriano não significa a morte bacteriana, de modo que este método não consegue distinguir os efeitos bactericidas e bacteriostáticos (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Dessa forma, os ensaios de difusão em ágar, permitem apenas uma triagem da atividade antimicrobiana de produtos naturais, direcionando as análises para determinação da CIM (AMPARO et al., 2018). No entanto, o ensaio de difusão em disco oferece muitas vantagens em relação a outros métodos: simplicidade, baixo custo, capacidade de testar números enormes de microrganismos e agentes antimicrobianos e a facilidade de interpretar os resultados fornecidos (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Existem diversas diretrizes aprovadas para o teste de suscetibilidade antimicrobiana por diluição em caldo de bactérias

fastidiosas ou não exigentes, leveduras e fungos filamentosos. Os padrões mais reconhecidos são fornecidos pelo CLSI e pelo EUCAST (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Ensaios de diluição em caldo são aqueles em que as substâncias testadas são adicionadas a um meio líquido de cultura onde o microrganismo desafiado é inoculado (SILVEIRA et al., 2009). Esses ensaios levam em consideração a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. Neste caso, entende-se por proporção a densidade da turbidez resultante do crescimento microbiano (OSTROSKY et al., 2008). Após incubação, a proporção do crescimento microrganismo é determinada pela leitura visual direta ou turbidimétrica, com uso de espectrofotômetro em comprimento de onda apropriado (SILVEIRA et al., 2009). A CIM refere-se a menor concentração do antimicrobiano testado que inibe o crescimento do microrganismo de interesse, sendo normalmente expresso em  $\mu\text{g/mL}$  ou  $\text{mg/L}$  (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; OLIVEIRA et al., 2011).

A diluição em caldo é considerada o método mais sensível para determinação da CIM. Duas metodologias de diluição podem ser empregadas: em tubos (macrodiluição) ou em placas de 96 poços (microdiluição) (AMPARO et al., 2018; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; MIRA DE BONA et al., 2014; OSTROSKY et al., 2008). Ostrosky e colaboradores (2008) mencionaram o método de microdiluição em caldo como sendo o mais confiável para avaliar agentes antimicrobianos, por fornecer resultados quantitativos e não ser influenciado pela velocidade de crescimento do microrganismo. Além disso, a microdiluição possui vantagens como reprodutibilidade, pequena quantidade de amostra requerida, economia de reagentes, de meio de cultura e de espaço e possibilidade de teste simultâneo de um grande número de repetições, de diversas diluições e diferentes amostras em apenas uma placa por microrganismo, aumentando a confiabilidade dos testes (AMPARO et al., 2018; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; MIRA DE BONA et al., 2014; OSTROSKY et al., 2008).

Para a determinação da CIM, dispositivos automatizados de visualização, a exemplo do espectrofotômetro, podem facilitar a leitura dos testes de microdiluição e determinar com maior precisão o *endpoint* do crescimento microbiano entre os poços. Além disso, métodos colorimétricos baseados no uso de reagentes corantes foram desenvolvidos. Sais de tetrazólio, brometo de 3 - (4, 5 - dimetiliazol - 2 - il) - 2, 5 - difeniltetrazólio (MTT) e o 2, 3 - bis {2 - metoxi - 4 - nitro - 5 - [(sulfenilamino) carbonil] - 2H - hidróxido de tetrazólio} (XTT), são

frequentemente usados na determinação da CIM dos ensaios de microdiluição antibacteriana. O corante azul Alamar (resazurina), um indicador de crescimento efetivo, também pode ser usado para esse fim (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

A comparação entre métodos distintos já foi realizada por vários autores. Alves e colaboradores (2008) e Scorzoni e colaboradores (2007) compararam o método de microdiluição com métodos de difusão em ágar e concluíram que o primeiro é mais recomendado para determinação da CIM, pois é mais sensível, reprodutível e permite a quantificação do crescimento microbiano enquanto que, a difusão em placa de Petri constitui em um método qualitativo. Por isso, esses métodos (diluição e difusão) não são necessariamente comparáveis (NASCIMENTO et al., 2007).

Independente do método escolhido para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana e para a descoberta de novos agentes antimicrobianos, existe a necessidade de adaptações metodológicas para adequação dos protocolos padronizados aos produtos naturais em teste. Entretanto, é imperativo ter cuidado com determinados fatores que podem afetar a suscetibilidade dos métodos e estes devem atender ao que está disposto nos protocolos dos órgãos normalizadores, a fim de, garantir uma abordagem experimental precisa, resultados reprodutíveis e confiáveis e, ainda, permitir que outros pesquisadores comparem os resultados.

A susceptibilidade dos agentes antimicrobianos é dependente da quantidade do inóculo. A padronização desse se faz, portanto, necessária e a quantidade inoculada deverá ser estabelecida para cada método desenvolvido. Para os testes de microdiluição o CLSI padroniza como concentração final, no início do período de incubação,  $5 \times 10^5$  UFC/mL para bactérias. Segundo recomendação da norma M7-A7 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006), a preparação do inóculo inicial para os métodos de diluição e difusão deve ser feita conforme padrão de leitura 0,5 na escala McFarland, que fornece densidade de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL. Alternativamente, o inóculo pode ser ajustado fotometricamente ( $\lambda = 625$  nm) e o resultado da absorbância ajustado para o intervalo de 0,08 a 0,10. As placas devem ser inoculadas em até 15 minutos após a padronização do inóculo, para que a densidade celular não esteja alterada (AMPARO et al., 2018; OSTROSKY et al., 2008; CLSI, 2006).

A incubação dos microrganismos deve ser feita à 35-37°C para o crescimento de bactérias. No método de diluição, as condições de crescimento dos microrganismos nos tubos ou poços da microplaca

devem ser semelhantes, propiciando-se a mesma temperatura e agitação. No método de difusão as placas devem ser incubadas com o cuidado de se manter a temperatura homogênea na estufa. Condições alternativas podem ser utilizadas, se forem essenciais ao crescimento do microrganismo em teste, mantendo-se a condição modificada ao longo de todo experimento (AMPARO et al., 2018; OSTROSKY et al., 2008; CLSI, 2006).

No caso dos métodos de difusão em placa, a espessura e a uniformidade do ágar são essenciais à boa resolução dos resultados. Deve-se controlar rigorosamente o volume de ágar transferido à placa de Petri, e o meio de cultura deve ser distribuído de modo a evitar formação de estrias superficiais e bolhas (OSTROSKY et al., 2008; CLSI, 2006).

A dificuldade de solubilização é uma das características dos produtos naturais que impede que a metodologia proposta pelo CLSI seja seguida integralmente, exigindo modificações. Dessa forma, outro fator que pode afetar a suscetibilidade dos métodos é a forma de solubilização da substância teste para adição desta no meio de cultura. O solvente ou o agente emulsionante pode inibir o crescimento microbiano e levar a resultados falso-positivos. Independente do agente solubilizante utilizado, é importante realizar um controle negativo com quantificação do crescimento microbiano, pelo menos na maior concentração do agente solubilizante empregado. Isso porque, mesmo que a inibição seja de fraca intensidade, pode interferir nos resultados. Além disso, o controle deve ser realizado em todos os testes, pois a inibição pode variar com as cepas utilizadas (AMPARO et al., 2018).

Sendo assim, é recomendável o seguimento das normas estabelecidas pelo CLSI, no que se refere à padronização da concentração de inóculo, às condições de incubação e ao emprego de controle de inibição do agente solubilizante nos testes antimicrobianos de produtos naturais.

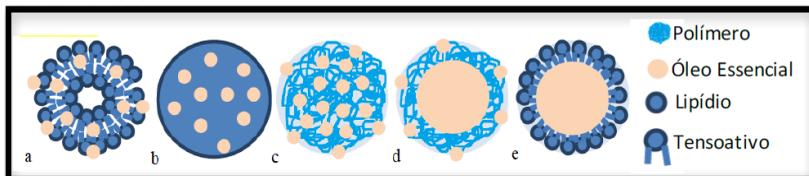
## 2 NANOENCAPSULAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

O conceito de nanotecnologia foi introduzido por Richard Feynman, em 1959. Mais tarde, em 1974, Nario Taniguchi cunhou o termo nanotecnologia e usou-o para a manipulação de partículas menores que 1  $\mu\text{m}$  (PRAKASH et al., 2018). A nanotecnologia é focada na caracterização, fabricação, manipulação e aplicação de estruturas biológicas e não biológicas em escala nanométrica. Estruturas nessa escala de tamanho apresentam propriedades funcionais únicas, não encontradas em escalas de maior dimensão (ASSIS et al., 2012).

O fato dos OE serem considerados produtos naturais torna-os altamente desejáveis à utilização em muitas aplicações comerciais devido à crescente demanda dos consumidores por aditivos não sintéticos (CHANG; McLANDSBOROUGH; McCLEMENTS, 2013). Contudo, alguns fatores desencorajam a utilização dos OE na sua forma livre. Considerando que os principais constituintes dos OE mostram-se suscetíveis à oxidação mediada pela luz ou pelo calor, não é recomendado expor a pele diretamente ao OE, uma vez que, os produtos metabólicos da degradação podem causar potenciais reações alérgicas. A elevada volatilidade dos componentes dos OE também desencoraja a sua utilização livre. A deterioração oxidativa pode alterar a composição funcional dos constituintes ativos, bem como suas propriedades antimicrobianas (PRAKASH et al., 2018; TAMPAU; GONZÁLEZ-MARTINEZ; CHIRALT 2017; NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; SÃO PEDRO et al., 2013). Além disso, a baixa solubilidade aquosa também restringe potenciais aplicações dos OE, por reduzir sua biodisponibilidade e eficácia. Todos estes fatores, de forma isolada ou em associação, limitam a aplicação dos OE na forma *in natura* como potenciais agentes antimicrobianos ingredientes de produtos com ação germicida (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; TAMPAU; GONZÁLEZ-MARTINEZ; CHIRALT 2017; SÃO PEDRO et al., 2013). Em geral, como os óleos essenciais são constituídos de uma mistura complexa de compostos lipofílicos voláteis, a associação a sistemas coloidais submicrométricos têm sido considerada uma estratégia promissora à superação das limitações do uso de compostos naturais com atividade antimicrobiana (PRAKASH et al., 2018; CODEVILLA et al., 2015; SÃO PEDRO et al., 2013). Recentemente, pesquisas têm sido conduzidas com enfoque no desenvolvimento de novos sistemas nanocarreadores, os quais permitem contornar as limitações de uso dos OE, além de apresentarem diversas vantagens em relação aos sistemas de liberação de ativos convencionais (ALBERTI et al., 2017; NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; CODEVILLA et al., 2015).

Os OE e seus fitoconstituintes com atividade antimicrobiana podem ser associados a sistemas nanocarreadores, orgânicos ou inorgânicos. A associação destes compostos a sistemas orgânicos, tais como nanopartículas lipídicas (ex. lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e nanoemulsões) ou poliméricas (ex. nanocápsulas e nanoesferas) biocompatíveis, vem sendo alvo de estudos nos últimos anos (SÃO PEDRO et al., 2013) (Figura 1).

Figura 1 - Ilustração esquemática dos tipos de nanopartículas utilizados à encapsulação de OE antimicrobianos: **a)** lipossomas; **b)** nanopartículas lipídicas sólidas; **c)** nanoesferas poliméricas; **d)** nanocápsulas poliméricas; **e)** nanoemulsões.



Fonte: Adaptado de São Pedro et al. (2013).

As nanopartículas poliméricas são classificadas como nanocápsulas e nanoesferas (ALBERTI et al., 2017; ZORZI et al., 2017; BAHAMONDE-NORAMBUENA, 2015; CODEVILLA et al., 2015; REIS et al., 2006). As nanocápsulas são sistemas reservatórios, formados por um núcleo, geralmente, constituído de um óleo envolto por um invólucro polimérico. As nanoesferas, por sua vez, são sistemas matriciais formados por uma matriz polimérica. Os ativos podem estar adsorvidos/dissolvidos tanto na matriz polimérica quanto no núcleo oleoso. Ao se considerar o uso destas partículas como antimicrobianos, a matriz polimérica deve ser constituída por materiais biocompatíveis. Estes sistemas podem ser preparados utilizando polímeros naturais, sintéticos e semi-sintéticos como, por exemplo, policaprolactona (PCL), poli (ácido láctico) (PLA), poli ácido láctico-co-glicólico (PLGA), polialquilenocianoacrilato, gelatina e quitosana (ALBERTI et al., 2017; CODEVILLA et al., 2015; BAHAMONDE-NORAMBUENA, 2015; REIS et al., 2006).

As nanopartículas lipídicas podem ser classificadas em lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) (MARCATO, 2009). Os lipossomas são uma associação coloidal de lipídios anfífilos que se organizam espontaneamente em vesículas esféricas compostas por uma ou mais bicamadas de fosfolipídios (BARANAUSKAITE et al., 2018; ALBERTI et al., 2017; CODEVILLA et al., 2015; SÃO PEDRO, 2013; MARCATO, 2009). Devido à natureza anfífilica dos fosfolipídios, os lipossomas podem ser empregados como veículos tanto para moléculas lipofílicas quanto hidrofílicas (PRAKASH et al., 2018; CODEVILLA et al., 2015). Entre os carreadores utilizados para produtos farmacêuticos ou cosméticos, os lipossomas são os promotores mais bem-sucedidos da absorção cutânea de fármacos. As semelhanças estruturais com as membranas biológicas permitem uma melhor penetração na barreira

epidérmica em comparação com outros sistemas de liberação (ALBERTI et al., 2017).

As NLS são formadas por lípidios sólidos à temperatura ambiente estabilizados por tensoativos hidrofílicos (PRAKASH et al., 2018; CODEVILLA et al., 2015; MARCATO, 2009). Os lípidios utilizados na preparação de NLS são triglicerídeos, mistura de glicerídeos ou ceras (MARCATO, 2009). Por apresentarem núcleo lipídico, são transportadores adequados ao encapsulamento de compostos lipofílicos quimicamente instáveis, sendo amplamente utilizados como agentes transportadores de OE (PRAKASH et al., 2018; SÃO PEDRO, 2013). Para melhorar a eficiência de encapsulação e minimizar a expulsão do ativo das partículas durante o período de armazenamento, no final dos anos 90 surgiram os CLN (carreadores lipídicos nanoestruturados), como uma segunda geração dos NLS (COLA et al., 2016; MARCATO, 2009). Os CLN são compostos por uma mistura de lípidios sólidos e líquidos, à temperatura ambiente, formando estruturas que possuem imperfeições. As imperfeições geram mais espaço para acomodar mais ativo aumentando a eficiência de encapsulação (COLA et al., 2016). Os CLN apresentam como vantagem, sobre as NLS o fato de que o ativo não é expulso do interior das nanopartículas, como ocorre nas NLS (COLA et al., 2016). Entretanto, tanto os CLN quanto as NLS apresentam baixa eficiência de encapsulação de ativos hidrofílicos, que pode ser aumentada utilizando baixas concentrações do ativo (MARCATO, 2009).

Por estas razões, a nanoencapsulação tem sido utilizada como alternativa para melhorar a estabilidade, eficácia, viabilidade e solubilidade dos ativos naturais. O emprego desta alternativa tecnológica também permite o desenvolvimento de sistemas carreadores capazes de transportar os EO através da membrana celular para que, ao serem liberados no interior da membrana citoplasmática, exerçam sua atividade antimicrobiana em diferentes sítios de ação, reduzindo consideravelmente a possibilidade de desenvolvimento de resistência microbiana (PRAKASH et al., 2018; BAJERSKI et al., 2016; KAMIMURA et al., 2014).

## **2.1 Nanoemulsões**

Dentre os sistemas nanocarreadores existentes, as nanoemulsões apresentam promissora aplicação como carreadores de ativos, especialmente aqueles com reduzida hidrossolubilidade (BAJERSKI et al., 2016; MARCATO, 2009; BRUXEL et al., 2012). Nanoemulsões podem ser definidas como sistemas heterogêneos nos quais um líquido

imiscível (fase interna) é disperso em outro (fase externa) na forma de gotículas de dimensões nanométricas, uniformemente dispersas, devido à presença de um agente emulsionante (ALBERTI et al., 2017; ZORZI et al., 2017; CODEVILLA et al., 2015; BRUXEL et al., 2012; ASSIS et al., 2012). A fase interna é também conhecida como fase dispersa ou fase descontínua, enquanto a fase externa é chamada de meio de dispersão ou fase contínua. O agente emulsionante é também conhecido como intermediário ou interfase (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015).

O termo nanoemulsão refere-se também a uma miniemulsão que é uma dispersão fina óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), estabilizada por uma película interfacial de molécula tensoativa com uma gama de tamanho de gotícula de 100-600 nm (ALBERTI et al., 2017; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; BOUCHEMAL et al., 2004). Assim, alguns autores se referem às nanoemulsões como miniemulsões, emulsões submicrométricas ou emulsões ultrafinas (HALNOR et al., 2018; ALBERTI et al., 2017; YUKUYAMA, et al., 2016; BAJERSKI et al., 2016; MANGALE et al., 2015; KANWALE et al., 2015; BANGIA; OM, 2015; MISHRA; SONI; MISHRA, 2014; SUTRADHAR; AMIN, 2013). Entretanto, o termo nanoemulsão tem sido mais utilizado por dar uma ideia da escala de tamanho nanométrico das gotículas (ASSIS et al., 2012).

Segundo Bruxel e colaboradores (2012), existe na literatura inconsistências relacionadas aos conceitos de nanoemulsões em relação às microemulsões. Apesar destes sistemas poderem apresentar características estruturais e visuais semelhantes em determinadas condições, diferenciam-se quanto à estabilidade termodinâmica. As microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis, enquanto as nanoemulsões são sistemas cineticamente estáveis (YUKUYAMA, et al., 2016; BANGIA; OM, 2015; BRUXEL et al., 2012; DAMASCENO et al., 2011; BOUCHEMAL et al., 2004). Apesar da nomenclatura empregada, microemulsões apresentam, geralmente, tamanho de gotícula inferior às nanoemulsões, além de um aspecto translúcido (BRUXEL et al., 2012; BOUCHEMAL et al., 2004). As nanoemulsões possuem melhor eficácia em termos de aparência, estabilidade, textura e atividade relativamente às microemulsões (PRAKASH et al., 2018).

Gotículas de diâmetro inferior ao micrômetro e glóbulos com 50 a 1000 nm de diâmetro são, usualmente, observadas em nanoemulsões. Normalmente, o tamanho médio das gotas é de 50 a 500 nm (KANWALE et al., 2015; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; ASSIS et al., 2012; BHATT; MADHAV, 2011). Parece não haver consenso entre os autores quanto ao valor limite superior de tamanho

das nanopartículas, alguns considerando 500 nm como limite superior. Entretanto, como não há mudança drástica nas propriedades físico-químicas quando o tamanho da gota de emulsão encontra-se na faixa nanométrica, o limite de tamanho não pode ser considerado uma questão-chave (YUKUYAMA, et al., 2016). Dependendo do tamanho das gotículas, as nanoemulsões podem ser transparentes/translúcidas (50-200 nm) ou leitosas (até 500 nm) (YUKUYAMA, et al., 2016; CODEVILLA et al., 2015).

As nanoemulsões podem ser classificadas em três tipos:

(a) nanoemulsão óleo em água (O/A), na qual o óleo é disperso na fase aquosa contínua;

(b) nanoemulsão água em óleo (A/O), em que as gotículas de água são dispersas em uma fase oleosa contínua;

(c) nanoemulsão bi-contínua, onde os microdomínios de óleo e água estão interdispersos dentro do sistema (HALNOR et al., 2018; SAVARDEKAR; BAJAJ, 2016; YUKUYAMA, et al., 2016; CODEVILLA et al., 2015; KANWALE et al., 2015; BANGIA; OM, 2015; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015).

As nanoemulsões também podem ser classificadas de acordo com o tipo de surfactante usado, a saber: nanoemulsão neutra, onde um surfactante neutro é usado; nanoemulsão catiônica, contendo um surfactante catiônico e nanoemulsão aniônica, onde o surfactante empregado é aniônico (HALNOR et al., 2018).

As nanoemulsões são mais vantajosas em relação às emulsões e suspensões por apresentarem maior estabilidade frente à cremação, sedimentação, floculação e coalescência devido ao reduzido diâmetro das partículas, além de permitirem o fácil escalonamento da produção (BAJERSKI et al., 2016; YUKUYAMA et al., 2016; JÚNIOR et al., 2013; SÃO PEDRO et al., 2013; ANTON; VANDAMME, 2011). Como resultado do reduzido tamanho de partícula, a cinética de desestabilização das nanoemulsões é lenta (aproximadamente meses), tornando-as cineticamente estáveis (BAJERSKI et al., 2016; SÃO PEDRO et al., 2013; ANTON; VANDAMME, 2011). Normalmente, devido à instabilidade termodinâmica são obtidas por agitação mecânica (HALNOR et al., 2018; BAJERSKI et al., 2016; DAMASCENO et al., 2011).

### 2.1.1 Composição das nanoemulsões

Os três componentes principais das nanoemulsões são: fase oleosa, surfactante e a fase aquosa (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; SAVARDEKAR; BAJAJ, 2016; BRUXEL et al., 2012).

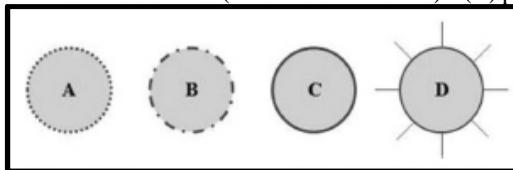
A fase oleosa das nanoemulsões, normalmente, é selecionada com base na solubilidade do ativo a ser veiculado, na sua estabilidade, bem como na estabilidade da formulação desenvolvida (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; SUTRADHAR; AMIN, 2013; BRUXEL et al., 2012). Em algumas situações, o próprio componente ativo é um dos constituintes da fase oleosa, senão o único.

O processo de seleção de surfactantes ou emulsificantes adequados, capazes de formar mono ou multicamadas em torno das gotículas oleosas, de forma a reduzir a tensão interfacial e/ou aumentar a repulsão entre as gotículas, é um dos principais fatores relacionados à estabilidade do sistema coloidal (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; BRUXEL et al., 2012). Os surfactantes também evitam a coalescência induzida que pode ser causada pelo cisalhamento das gotículas durante o processo de nanoemulsificação (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017). Os tensoativos de origem natural, tais como os fosfolipídios, são preferidos aos sintéticos, por serem biocompatíveis e apresentarem resultados adequados de emulsificação. Os fosfolipídios mais comumente utilizados no preparo das nanoemulsões podem ser originários de fontes naturais, como as lecitinas, ou semissintéticos, como dioleilfosfatidiletanolamina e diestearilfosfatidilcolina. A lecitina é obtida de diferentes fontes, geralmente, de origem animal (gema de ovo) ou vegetal (soja), sendo composta por uma mistura de diferentes fosfolipídios, principalmente, fosfatidilcolina. A lecitina é biocompatível e biodegradável, sendo de grande importância na estabilidade a longo prazo das emulsões por conferir carga superficial negativa à interface da estrutura formada (potencial zeta negativo), permitindo a repulsão eletrostática entre as gotículas dispersas (ZORZI et al., 2017; NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; BRUXEL et al., 2012). Este composto anfifílico se posiciona entre as duas fases da emulsão (aquosa e oleosa), originando uma película interfacial que proporciona estabilidade ao sistema (HALNOR et al., 2018; BAJERSKI et al., 2016; DAMASCENO et al., 2011).

Apesar da preferência pelos tensoativos de origem natural, os agentes emulsionantes sintéticos também têm sido amplamente empregados para conferir maior estabilidade à emulsão. Tensoativos não iônicos do grupo dos poloxâmeros e polioxietileno-sorbitanos (Tweens<sup>®</sup>) têm se mostrado promissores em combinação com os fosfolipídeos, pois levam à formação de filmes mistos compactos, conferindo maior estabilidade à formulação. Por causa da preocupação com a toxicidade, o uso de surfactantes não-iônicos, que permitem produzir formulações não tóxicas, é preferido, em detrimento do uso dos

surfactantes iônicos (HALNOR et al., 2018). Existe, ainda, a possibilidade de adição de tensoativos aniônicos, como os ácidos deoxicólico ou ácido oleico, por exemplo, visando conferir maior carga negativa à interface e, conseqüentemente, maior repulsão eletrostática entre as gotículas (SUTRADHAR; AMIN, 2013; BRUXEL et al., 2012). Deve-se notar que os tensoativos desempenham um papel importante na redução do tamanho de gotícula (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017). Nesta lógica, diferentes propostas de formulações nanoemulsionadas podem ser desenvolvidas, modificando-se somente os componentes da interface (Figura 2).

Figura 2 - Representação esquemática dos tipos de nanoemulsões, conforme composição da interface: (A) apenas fosfolipídeos como tensoativos; (B) fosfolipídeos adicionados de um tensoativo não iônico; (C) fosfolipídeos adicionados de tensoativos iônicos (aniônico ou catiônico) e (D) polímeros hidrofílicos.



Fonte: Adaptado de Bruxel et al. (2012).

O co-surfactante é um constituinte opcional às nanoemulsões que ajuda a reduzir a tensão interfacial entre as fases oleosa e aquosa, além de promover a fluidificação do filme interfacial formado pelo surfactante, o que impede a elevação significativa da viscosidade do sistema (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017). São exemplos de co-surfactantes o propilenoglicol, etanol e butanol (HALNOR et al., 2018).

Por fim, a fase aquosa utilizada na formulação de nanoemulsão é, geralmente, água. Na fase aquosa da nanoemulsão, ainda, podem ser incorporados agentes conservantes, reguladores de pH e agentes de tonicidade (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; BRUXEL et al., 2012).

### 2.1.2 Técnicas de preparação das nanoemulsões

As nanoemulsões são sistemas não equilibrados de líquidos estruturados e, portanto, sua preparação envolve a entrada de uma grande quantidade de energia ou surfactantes e, em alguns casos, uma combinação de ambos (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; LOVELYN, ATTAMA, 2011). Vários métodos de preparação são empregados no desenvolvimento de nanoemulsões e podem ser divididos basicamente

em métodos de alta e baixa energia (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; YUKUYAMA, et al., 2016; CODEVILLA et al., 2015; HOLKEM et al., 2015; BRUXEL et al., 2012; LOVELYN, ATTAMA, 2011).

Os métodos que empregam alta energia requerem dispositivos mecânicos para produzir fortes forças disruptivas para romper as gotículas da fase dispersa (oleosa e aquosa) para obter nanoemulsões com diâmetros reduzidos. Estes métodos incluem a microfluidização, homogeneização à alta pressão e sonicação. Nestes métodos, a preparação da nanoemulsão ocorre, geralmente, em duas etapas: a primeira consiste na produção de uma emulsão grosseira e a segunda na redução do diâmetro de gotícula com auxílio de equipamento ou dispositivo específico (HALNOR et al., 2018; NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; BRUXEL et al., 2012; BHATT; MADHAV, 2011; ANTON; VANDAMME, 2011; ALMEIDA; TEIXEIRA; KOESTER, 2008). O tamanho de partícula depende do tipo de instrumento empregado e das condições operacionais, como o tempo de processo e temperatura, juntamente com as propriedades e composição da amostra (HALNOR et al., 2018; LOVELYN, ATTAMA, 2011).

A homogeneização à alta pressão consiste na passagem de uma dispersão grosseira por um orifício, sob pressão elevada, em turbulência intensa, produzindo então, uma emulsão com um diâmetro de gotícula extremamente pequeno. Os parâmetros de processo, tais como tempo e velocidade afetam significativamente a distribuição de tamanho das partículas da nanoemulsão. A microfluidização baseia-se na utilização de uma bomba de alta pressão (500 a 20.000 psi) que força a passagem da emulsão através de uma série de microcanais. Tanto a homogeneização de alta pressão quanto as técnicas de microfluidização podem ser usadas para preparação de nanoemulsões em escala laboratorial e industrial. A sonicação consiste na aplicação do ultrassom, produzindo ondas interfaciais instáveis e rompendo as gotículas primárias em gotículas de tamanho nanométrico (HALNOR et al., 2018; NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; SAVARDEKAR; BAJAJ, 2016; YUKUYAMA, et al., 2016; KANWALE et al., 2015; MANGALE et al., 2015; HOLKEM et al., 2015; ASSIS et al., 2012; SHAH; BHALODIA; SHELAT, 2010). As características de uma formulação preparada com o auxílio deste método dependem, principalmente, da pré-emulsão utilizada (BRUXEL et al., 2012). Por necessitar de reduzida quantidade de surfactante para produzir uma nanoemulsão homogênea, a sonicação é o método mais vantajoso dentre os processos mecânicos. Esta técnica é utilizada, principalmente, para a produção de nanoemulsões em escala laboratorial (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; HOLKEM et al., 2015).

Apesar dos métodos de emulsificação de alta energia serem efetivos na redução do diâmetro de gotícula, produzindo nanoemulsões com propriedades desejadas, e terem fácil escalabilidade industrial, podem não ser adequados para fármacos termolábeis, tais como retinóides e macromoléculas, incluindo proteínas, enzimas e ácidos nucleicos (BRUXEL et al., 2012; LOVELYN, ATTAMA, 2011).

Os métodos de baixa energia, por sua vez, não fazem uso de energia extrema gerada por dispositivos mecânicos e sim do potencial químico dos componentes da formulação (YUKUYAMA, et al., 2016; ASSIS et al., 2012; ANTON; VANDAMME, 2011). Num método de baixa energia, usualmente, realiza-se uma suave agitação para gerar as nanoemulsões. Este processo depende, principalmente, das propriedades físico-químicas intrínsecas dos surfactantes, co-surfactantes e demais excipientes que compõem a formulação (YUKUYAMA, et al., 2016).

Os métodos de baixa energia incluem os métodos de inversão de fases, método de auto-nanoemulsificação (livre de solvente orgânico) e o método de emulsificação espontânea - difusão do solvente (HALNOR et al., 2018; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; MANGALE et al., 2015; BRUXEL et al., 2012; BHATT; MADHAV, 2011). Estas técnicas são interessantes porque a emulsificação é formada alterando-se os parâmetros que afetam o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) do sistema, como temperatura e composição, por exemplo (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; LOVELYN, ATTAMA, 2011).

No método de inversão de fases ou método PIT (do inglês *Phase Inversion Temperature*), a transição de fases produzida durante o processo de emulsificação ocorre mantendo a composição do sistema constante, mas alterando a temperatura (HALNOR et al., 2018; NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; KANWALE et al., 2015; MANGALE et al., 2015; LOVELYN, ATTAMA, 2011; ALMEIDA; TEIXEIRA; KOESTER, 2008). Este método não é indicado para a incorporação de fármacos termolábeis devido ao aquecimento dos componentes envolvidos, entretanto, trata-se de um método que não utiliza solventes orgânicos (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; HOLKEM et al., 2015).

No método da emulsificação espontânea livre de solvente (método de auto-nanoemulsificação), as nanoemulsões também são geradas sem o uso de solvente orgânico e não há alternância de temperatura (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; KANWALE et al., 2015; PATEL et al., 2013; LOVELYN, ATTAMA, 2011). Neste método, a produção da nanoemulsão ocorre através da adição gradual da fase aquosa, na forma de uma solução de surfactante, sobre a fase oleosa

com agitação suave, a temperatura constante (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017). Já no método de emulsificação espontânea-difusão do solvente, a fase oleosa é dissolvida em solventes orgânicos miscíveis em água (acetona, etanol, e.g.). A fase orgânica é vertida sobre a fase aquosa contendo surfactante para produzir espontaneamente a nanoemulsão por difusão rápida de solvente orgânico (KANWALE et al., 2015; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; MANGALE et al., 2015; BRUXEL et al., 2012) e a transição de fases produzida durante o processo de emulsificação ocorre, geralmente, em temperatura constante, alterando a composição do sistema (ALMEIDA; TEIXEIRA; KOESTER, 2008). Este método envolve três etapas: (a) preparação de uma solução orgânica homogênea constituída por óleo e surfactante lipofílico em solvente miscível em água e de uma solução aquosa contendo o surfactante hidrofílico; (b) a fase orgânica é adicionada na fase aquosa, sob agitação magnética moderada, e a emulsão é espontaneamente formada pela difusão do solvente orgânico na fase externa aquosa levando à formação de nanogotículas; (c) por fim, o solvente orgânico é removido por evaporação sob pressão reduzida e o volume ajustado conforme desejado (SAVARDEKAR; BAJAJ, 2016; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; MISHRA; SONI; MISHRA, 2014; BHATT; MADHAV, 2011). Através desta técnica, a nanoemulsão pode ser obtida mesmo sem o uso de surfactante. Uma das principais limitações do método de emulsificação espontânea - difusão do solvente é a alta proporção de solvente orgânico usado para produzir a faixa desejada de tamanho das partículas (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017).

Os métodos de emulsificação espontânea são interessantes para estudos de formulação, pois são de fácil execução em escala laboratorial, não requerem equipamentos sofisticados, não utilizam altas temperaturas e, geralmente, levam à formação de formulações com pequeno tamanho de gotícula. Através dessas técnicas é possível preparar nanoemulsões com propriedades similares àquelas obtidas por métodos físicos sem o uso de polímeros (BAJERSKI et al., 2016; ALMEIDA; TEIXEIRA; KOESTER, 2008). Em resumo, dependendo do método utilizado, o processo de emulsificação pode ser influenciado por diversos fatores. Assim, é essencial a otimização das condições de operação visando a obtenção da emulsão com as características desejadas (BRUXEL et al., 2012).

### 2.1.3 Caracterização das propriedades físico-químicas das nanoemulsões

Em função de sua natureza coloidal, dificuldades técnicas são encontradas na caracterização físico-química das nanopartículas (BRUXEL et al., 2012; SCHAFFAZICK et al., 2003). A caracterização das suspensões engloba a avaliação morfológica, a distribuição de tamanho de partícula, a determinação do potencial zeta e do pH (HALNOR et al., 2018; MANGALE et al., 2015; BHATT; MADHAV, 2011; SHAH; BHALODIA; SHELAT, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003), a determinação da quantidade de ingrediente ativo associado às nanoestruturas, a cinética de liberação do fármaco, a avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento e, ainda, estudos de permeação cutânea *in vitro* (BHATT; MADHAV, 2011; SHAH; BHALODIA; SHELAT, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003). O conjunto de informações geradas pela caracterização dos sistemas coloidais pode conduzir à proposição de modelos que descrevam a organização das nanopartículas em nível molecular, a qual é dependente da composição quali-quantitativa das formulações (SCHAFFAZICK et al., 2003)

#### 2.1.3.1 Diâmetro de gotícula e índice de polidispersão

A determinação do diâmetro de gotícula e da sua distribuição é uma análise fundamental nas nanoemulsões, sendo considerado o melhor método para prever a estabilidade do sistema (HALNOR et al., 2018; BRUXEL et al., 2012). O pequeno tamanho das gotículas das nanoemulsões está relacionado à estabilidade inerente destes sistemas contra cremação, sedimentação, floculação e coalescência (HALNOR et al., 2018; KANWALE et al., 2015). O diâmetro das gotículas é influenciado pela composição quali-quantitativa das formulações e pelo método de preparação utilizado (BRUXEL et al., 2012).

O índice de polidispersão (PDI, do inglês *polydispersity index*) é a medida da amplitude da distribuição do diâmetro das partículas e indica a qualidade ou homogeneidade da dispersão das gotas na formulação (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; LOVELYN, ATTAMA, 2011). É definido como a razão entre o desvio padrão e o tamanho médio das gotículas (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015). Quanto maior o valor da polidispersão, menor a uniformidade do tamanho das gotículas na nanoemulsão (SYED; SARKAR, 2018; BARANAUSKAITE et al., 2018; GALINDO-PÉREZ et al., 2018; KHATIBI et al., 2015;

CODEVILLA et al., 2015; LOVELYN; ATTAMA, 2011; KABRI et al., 2011; ALMEIDA et al., 2009; ALVES et al., 2007).

O tamanho das gotículas da nanoemulsão e a polidispersão podem ser avaliados pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons (PCS, do inglês *Photon Correlation Spectroscopy*), também chamada de espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*), usando um analisador de tamanho de partícula. As microscopias eletrônicas de varredura, transmissão e força atômica também têm sido empregadas na obtenção de informações relativas ao tamanho e morfologia das nanopartículas (SAVARDEKAR; BAJAJ, 2016; KANWALE et al., 2015; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; SCHAFFAZICK et al., 2003). A análise da distribuição de tamanho de nanopartículas pela técnica de espalhamento de luz tem sido defendida como o melhor método para prever a estabilidade da nanoemulsão (MANGALE et al., 2015).

#### 2.1.3.2. Potencial zeta

O potencial zeta desempenha um papel importante na estabilização de nanoemulsões, pois reflete a carga superficial das gotículas. O potencial zeta depende do grau de ionização do agente emulsificante e, portanto, é pH dependente. A presença de lipídios ionizados (e.g., lecitinas) parece ter um efeito favorável na estabilização do sistema, enquanto a adição de tensoativos não iônicos não afeta o potencial de superfície (BRUXEL et al., 2012; SCHAFFAZICK et al., 2003). Valores de potencial zeta relativamente altos, em módulo, são indicativos de boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação das nanopartículas, em função das colisões ocasionais destas (SCHAFFAZICK et al., 2003). Determinações de potencial zeta são realizadas com aparelhos de eletroforese Doppler como o Zetasizer<sup>®</sup>, ou eletroforese de *moving-boundary*, através da determinação da mobilidade eletroforética (KANWALE et al., 2015; BRUXEL et al., 2012; BHATT; MADHAV, 2011).

#### 2.1.3.3 pH

O valor de pH fornece informações relevantes sobre a estabilidade do sistema (SAVARDEKAR; BAJAJ, 2016; KANWALE et al., 2015). Os valores de pH refletem, ainda, as condições de armazenamento e processamento das formulações, com efeitos sobre a

estabilidade do sistema nanoestruturado. Assim, a redução do pH durante o armazenamento pode indicar a presença de ácidos graxos livres na formulação, provenientes da hidrólise do sistema tensoativo (fosfolipídeos) e dos triglicerídeos do núcleo oleoso (BRUXEL et al., 2012).

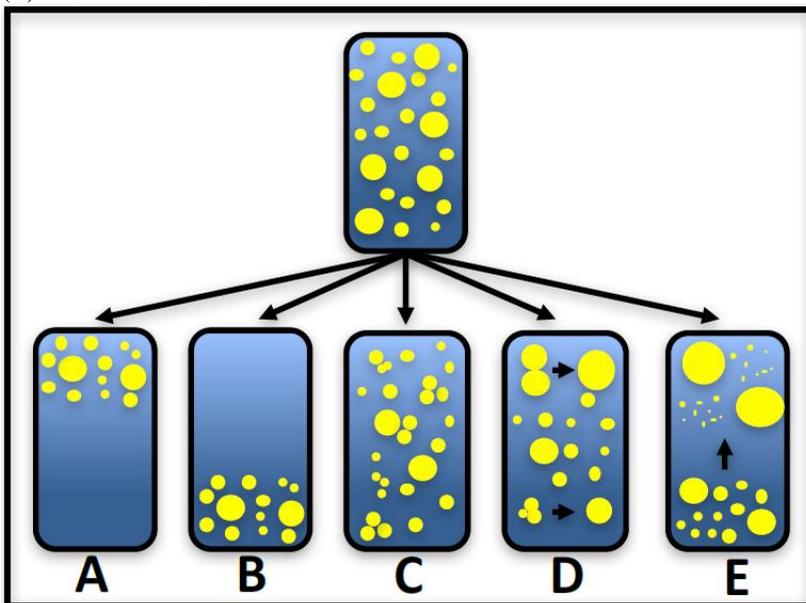
#### *2.1.3.4 Morfologia*

A morfologia das nanoemulsões é determinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Instrumentos mais sofisticados como espalhamento de raios-X ou de nêutrons, microscopia de força atômica (MFA) e microscopia crio-eletrônica também podem ser usados para explorar a estrutura e o comportamento das partículas nas suspensões coloidais. A MEV permite a obtenção de uma imagem tridimensional dos glóbulos ou partículas que se encontram dispersos na nanoemulsão. Na MET, a amostra é negativamente corada com uma solução aquosa a 1% de ácido fosfotungstico, ou a 2% de acetato de uranila, sobre um grid de cobre revestido com carbono (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017).

#### 2.1.4 Estudo de estabilidade das nanoemulsões

Segundo a Farmacopéia Americana, a estabilidade é definida como a amplitude na qual um produto mantém dentro de limites especificados, as mesmas propriedades e características que possuía no momento da sua fabricação, durante o seu período de armazenamento e uso (USP, 2007). As propriedades físico-químicas dos componentes da formulação, assim como o comportamento das fases da dispersão podem influenciar a estabilidade do sistema. A estabilidade das nanoemulsões decorre do diminuto tamanho das partículas, permitindo que a mistura não sofra os efeitos gravitacionais, mantendo-se em constante movimento Browniano (BAJERSKI et al., 2016; LOVELYN; ATTAMA, 2011; MANSUR et al., 2007; SCHAFFAZICK et al., 2003). Desta forma, efeitos como floculação, sedimentação ou cremação são, geralmente, evitados (KANWALE et al., 2015; MANSUR et al., 2007) (Figura 3).

Figura 3 - Representação gráfica dos fenômenos de instabilidade física de emulsões: (A) cremação, (B) sedimentação, (C) floculação, (D) coalescência e (E) efeito de Ostwald.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

A cremação (cremagem) ou sedimentação (promovidas pelas forças gravitacionais) são processos em que os glóbulos tendem a se separar da fase externa da emulsão, emergindo (cremação) ou sedimentando (sedimentação), dependendo da diferença de densidade entre as duas fases. A emulsão resultante terá duas porções, uma com maior volume de fase externa e a outra com maior volume de fase interna (SAVARDEKAR; BAJAJ, 2016; KANWALE et al., 2015; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015).

O processo de floculação ocorre quando as forças de atração de Van der Waals são superiores às de repulsão, gerando uma aproximação das gotículas (SAVARDEKAR; BAJAJ, 2016; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; MISHRA; SONI; MISHRA, 2014).

A coalescência é o resultado da colisão de duas ou mais gotículas da fase dispersa e ocorre quando o filme protetor entre gotas se rompe com a colisão e, estas se unem para formar uma única gota maior. Este processo pode acontecer quando as gotículas são pobres em cobertura de tensoativo (falta de tensoativo na formulação), ou pela formação de um número elevado

de gotas na nanoemulsão (SAVARDEKAR; BAJAJ, 2016; KANWALE et al., 2015; MISHRA; SONI; MISHRA, 2014; BRUXEL et al., 2012).

O efeito denominado maturação de Ostwald (do inglês, *Ostwald ripening*) é um fenômeno que altera a estabilidade do tamanho médio das partículas (BAJERSKI et al., 2016; MANSUR et al., 2007). Está relacionado à solubilidade da fase oleosa interna na fase contínua, permitindo que o óleo presente no interior das gotas menores migre através da fase contínua para uma gota maior, alimentando-a e resultando em uma gota menor ainda e outra muito maior. Este fenômeno pode ocorrer quando a concentração de tensoativo é alta, ou em excesso, formando micelas (BAJERSKI et al., 2016; SAVARDEKAR; BAJAJ, 2016; KANWALE et al., 2015; MISHRA; SONI; MISHRA, 2014; MANSUR et al., 2007). Quando o mecanismo de maturação de Ostwald ocorre, as gotas menores se tornam cada vez menores por alimentar gotas grandes, de forma que estas gotas remanescentes ainda menores podem coalescer por movimento Browniano, pois a cobertura de tensoativo fica abaixo do necessário para impedir a fusão dessas nanopartículas. Este fenômeno, conhecido como “coalescência induzida por maturação de Ostwald” pode produzir queda acentuada na distribuição de tamanho de gotas ao longo do tempo de armazenamento (MISHRA; SONI; MISHRA, 2014; NAZARZADEH; ANTHONYPILLAI; SAJJADI, 2013).

Dentre os fenômenos supracitados, os primeiros são reversíveis, enquanto o efeito de Ostwald é irreversível, sendo o principal mecanismo de instabilidade das nanoemulsões, uma vez que, os demais são minimizados pelo pequeno diâmetro da nanogotícula e pelo uso de surfactantes do tipo não iônico (SAVARDEKAR; BAJAJ, 2016; KANWALE et al., 2015; MISHRA; SONI; MISHRA, 2014; BRUXEL et al., 2012). Diversos fatores podem estar envolvidos no processo de instabilidade das nanoemulsões: físicos (temperatura, agitação, congelamento e descongelamento), químicos (pH, presença de eletrólitos, peroxidação lipídica), contaminação por micro-organismos ou, ainda, a própria composição do sistema (BRUXEL et al., 2012; SCHAFFAZICK et al., 2003). Um dos fatores comuns à instabilidade de uma emulsão contendo OE é a reação de oxidação, a qual resulta, principalmente, em alterações de odor e aparência do produto, podendo ser causada pelo oxigênio atmosférico ou ainda pela ação de microrganismos, especialmente na fase oleosa (SÃO PEDRO et al., 2013; BRUXEL et al., 2012).

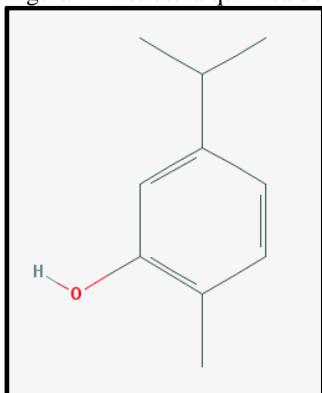
Segundo Silva e colaboradores (2010), as nanoemulsões aumentam a estabilidade física de ativos encapsulados susceptíveis à

hidrólise, oxidação e decomposição fotoquímica e, podem ainda, ser incorporadas em diversas formas farmacêuticas, incluindo as lipofílicas. As minúsculas dimensões das gotículas dispersas nas nanoemulsões reduzem muito a força da gravidade, evitando a formação de sedimentos durante o armazenamento do produto. O pequeno tamanho das gotículas também evita a floculação, mantendo o sistema disperso, sem separação. As gotículas também evitam a coalescência por não serem deformáveis e não apresentarem alterações da superfície (BARIL et al., 2012).

### 3 CARVACROL

O carvacrol, ou 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol, é um fenol isoprenílico monoterpênico cíclico (Figura 4) que tem como precursor o  $\gamma$ -terpineno (BARANAUSKAITE et al., 2018; MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018; FERREIRA et al., 2018; CARVALHO et al., 2018; SHARIFI-RAD et al., 2018; PUBCHEM, 2017; NOSTRO; PAPALIA, 2012; ÖZKAN; ERDOĞAN, 2011; BASER, 2008). É chamado 5-isopropil-2-metilfenol pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) e também conhecido como iso-timol. O carvacrol apresenta fórmula molecular  $C_{10}H_{14}O$ , peso molecular de 150,22 g/mol e densidade de 0,976 g/mL à temperatura ambiente (20 °C). Têm propriedades lipofílicas e é um líquido, amarelo pálido, insolúvel em água e altamente solúvel em éter etílico, etanol, acetona e hexano. Possui odor característico do orégano (*Origanum vulgare*) (SHARIFI-RAD et al., 2018; PUBCHEM, 2017; VINCENZI et al., 2004). O carvacrol comercial é sintetizado por métodos químicos e biotecnológicos (SHARIFI-RAD et al., 2018).

Figura 4 - Estrutura química do carvacrol.



Fonte: Pubchem (2017).

O carvacrol ocorre em plantas aromáticas da família Lamiaceae (Labiatae), incluindo espécies dos gêneros *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra*, *Thymus*, *Corydothymus* e *Lippia*, esta última da família Verbenaceae (FERREIRA et al., 2018; CARVALHO et al., 2018; SHARIFI-RAD et al., 2018; PUBCHEM, 2017; ZHOU et al., 2017; KAMIMURA et al., 2014; NOSTRO; PAPALIA, 2012; BASER, 2008). A presença dos fitoconstituintes carvacrol e timol, de forma isolada ou em combinação, como componentes majoritários de OE como, por exemplo, no óleo essencial de *O. vulgare*, é reconhecida como marcador de potencial antimicrobiano (OUAZZOU et al., 2012). Além da atividade antimicrobiana, o carvacrol exerce um amplo espectro de ações biológicas de grande importância em diferentes áreas como ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Atividades biológicas do carvacrol.

<b>Atividade</b>	<b>Referências</b>
Anti-inflamatória	Alavinezhad et al., 2018; Kara et al., 2015; Lima et al., 2013; Baraldi et al., 2010
Antioxidante	Baranauskaite et al., 2017; Beena; Kumar; Rawat, 2013; Özkan; Erdoğan, 2011, Chen et al., 2009
Antitumoral	Günes-Bayir et al., 2018; Khan et al., 2018a; Khan et al., 2018b; Elshafie et al., 2017; Arivalagan et al., 2015; Liang et al., 2013; Özkan; Erdoğan, 2011
Analgésica	Guimarães et al., 2014; Melo et al., 2012; Baraldi et al., 2010
Antiparasitária	Senra et al., 2013; Lage et al., 2013; Moraes et al., 2013
Antimicrobiana	Allaoua et al. 2018; Vinciguerra et al., 2018; Syed; Sarkar, 2018; Carvalho et al., 2018; Engel et al., 2017; Campana; Baffone, 2018; García-Salinas et al., 2018; Ryu et al., 2018; Miladi et al., 2017; Zhou et al., 2017; Wang et al., 2016; Araujo; Longo, 2016; Araújo et al., 2015; Sánchez; Aznar; Sánchez, 2015; Landry et al, 2015; Landry et al, 2014; Cho; Lee, 2014; Upadhyaya et al., 2013; Nostro; Papalia, 2012; Cristani et al., 2007
Larvicida	Mar et al., 2018; Campos et al., 2018; Govindarajan et al., 2016

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

### 3.1 Atividade antimicrobiana do carvacrol

Estudos realizados com OE e carvacrol relatam que os envelopes celulares constituem o alvo principal daquele metabólito secundário (MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018; OUAZZOU et al., 2012). A atividade antibacteriana do carvacrol tem sido atribuída aos seus consideráveis efeitos sobre as propriedades estruturais e funcionais da membrana citoplasmática. Devido à natureza hidrofóbica, o carvacrol interage com a bicamada lipídica da membrana citoplasmática bacteriana e se alinha às cadeias de ácidos graxos causando a expansão e desestabilização da estrutura da membrana, aumentando sua fluidez e permeabilidade (MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018; GARCÍA-SALINAS, 2018; SOW et al., 2017; ARAUJO; LONGO,

2016; MARYAM et al., 2015; NOSTRO; PAPALIA, 2012; OUZZOU et al., 2012; CRISTANI et al., 2007). Acredita-se que sua efetividade esteja relacionada à presença de um grupo hidroxil no anel fenólico que lhe confere alto poder reativo (ARAUJO; LONGO, 2016), levando à inativação das enzimas microbianas (GARCÍA-SALINAS, 2018). Recentemente, a análise por microscopia de força atômica confirmou o envelope celular como principal sítio de ação do carvacrol. O contato do carvacrol com as bactérias Gram-positivas (*Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium maltaromaticu*, *Lactobacillus plantarum*, *Listeria innocua*) e Gram-negativas (*E. coli*, *Hafnia alvei*, *Pseudomonas fragi*, *Serratia proteamaculans*) diminuiu o tamanho dos microrganismos (LA STORIA, et al., 2011).

Alterações da membrana citoplasmática bacteriana levam à formação de canais de membrana que permitem que íons e moléculas deixem o citoplasma (NOSTRO; PAPALIA, 2012). Ultee, Kets e Smid (1999) demonstraram que o carvacrol causa um esgotamento rápido do *pool* de ATP intracelular, seja pela redução da síntese de ATP ou pelo aumento de sua hidrólise. O estudo mostrou que a exposição do *Bacillus cereus* ao carvacrol determina a diminuição da concentração de ATP interno sem, entretanto, causar um aumento proporcional do ATP externo. Portanto, foi possível concluir que carvacrol não aumenta a permeabilidade da membrana ao ATP, mas que a depleção do *pool* de ATP interno é resultante de uma taxa reduzida de síntese ou de hidrólise aumentada. A exposição ao ativo monoterpênico torna a membrana permeável aos íons potássio e  $H^+$  (MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018; ULTEE et al., 2000), alterando o controle dos mecanismos e transporte das membranas celulares. A molécula não dissociada difunde-se através da membrana citoplasmática e se dissocia, liberando seu próton no citoplasma. Subsequentemente, retorna ao ambiente externo através da membrana, portador de um íon potássio. Fora da célula, o carvacrol substitui o potássio por um próton e retorna ao citoplasma da mesma maneira. Através deste mecanismo a síntese de ATP é inibida, conduzindo à morte celular (MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018; NOSTRO; PAPALIA, 2012; BASER, 2008; ULTEE et al., 2000). Neste contexto, estudos revelaram que o mecanismo de inativação do metabolismo celular do carvacrol está relacionado com os envelopes celulares e a capacidade deste metabólito em permeabilizar a membrana citoplasmática (OUZZOU et al., 2012).

Estudos adicionais do mecanismo de ação do carvacrol sobre o metabolismo celular evidenciaram que não somente a redução da síntese de ATP pela dissipação de prótons, mas também outros efeitos

secundários do carvacrol contribuem ao seu efeito bactericida ou bacteriostática (ULTEE et al., 2000). A inibição de enzimas e síntese de DNA, perda da pressão de turgescência, redução das atividades metabólicas e outros processos podem causar a diminuição da viabilidade celular durante a exposição ao carvacrol (ULTEE et al., 2000).

Apesar da potencial atividade antimicrobiana do carvacrol, a sua eficiência é limitada devido à alta volatilidade e baixa solubilidade em água (KAMIMURA et al., 2014). Neste sentido, uma estratégia promissora para contornar estas limitações é o encapsulamento do carvacrol em sistemas nanocarreadores, tais como as nanoemulsões.

### **3.2 Associação de carvacrol a sistemas nanoestruturados**

Nos últimos anos, os óleos essenciais têm atraído interesse como uma abordagem alternativa na medicina tradicional pela diversidade de atividades biológicas. Nesse campo, o carvacrol emergiu como uma molécula ativa por apresentar forte atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e negativas (MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018). Entretanto, a natureza hidrofóbica e a volatilidade do carvacrol bem como, sua suscetibilidade a oxidação mediada pela luz ou pelo calor, limitaram seu uso (LIU et al., 2018). Diferentes estratégias nanotecnológicas podem ser empregadas visando contornar essas limitações relacionadas às propriedades físico-químicas daquele metabólito secundário. O nanoencapsulamento proporciona uma barreira protetora ao carvacrol contra processos de degradação e volatilização e, ainda, por melhorar a solubilidade, aumenta a disponibilidade e a eficácia nos sítios de ação de interesse (BARANAUSKAITE et al., 2018; MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018; KOTRONIA et al., 2017). Segundo Liu e pesquisadores (2018), após a nanoencapsulação, os ativos antimicrobianos frequentemente mostram atividade melhorada em comparação aos ativos na sua forma *in natura*. Algumas estratégias nanotecnológicas empregadas para simplificar e otimizar a aplicação do carvacrol, principalmente, como agente antimicrobiano são apresentadas no quadro a seguir (Quadro 1).

Quadro 1 - Resumo das estratégias nanotecnológicas empregadas à associação de carvacrol a sistemas nanoestruturados.

Agente Encapsulante	Nanocarreador	Objetivo do Estudo	Resultados Reportados	Referência
Quitosana	Nanopartícula	Desenvolver nanopartículas de quitosana, contendo eugenol e carvacrol modificados e, ainda, avaliar atividades antioxidantes e antibacterianas ( <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> ) das nanopartículas bem como, a citotoxicidade em relação aos fibroblastos 3T3 de camundongos.	As nanopartículas, contendo carvacrol e eugenol modificados com a introdução de um grupamento aldeído, apresentaram atividade antioxidante e antibacteriana. A atividade antimicrobiana foi melhor ou igual a das nanopartículas sem ativo. Pode-se observar também que nanopartículas contendo eugenol apresentaram maior eficiência antibacteriana do que as nanopartículas contendo carvacrol tanto como contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Ensaios de citotoxicidade mostraram que a citotoxicidade das nanopartículas foram significativamente menores do que as dos ativos puros.	Chen et al., 2009
L- $\alpha$ -fosfatidilcolina de ovo e colesterol	Lipossoma	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> da incorporação lipossômica de carvacrol e timol isolados do óleo essencial de <i>Origanum dictamnus</i> L. foi avaliada contra quatro bactérias Gram positivas ( <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus mutans</i> e <i>Staphylococcus viridans</i> ); quatro bactérias Gram negativas ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> ); três fungos patogênicos	O carvacrol, apesar de sua baixa eficiência de encapsulação nas vesículas (4,16%), apresentou atividade antimicrobiana melhorada quando comparado ao composto livre empregado em concentrações mais elevadas.	Liolios et al., 2009

Agente Encapsulante	Nanocarreador	Objetivo do Estudo	Resultados Reportados	Referência
		humanos ( <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> e <i>Candida glabrata</i> ) e contra um patógeno alimentar ( <i>Listeria monocytogenes</i> ).		
Alginato de cálcio e Tween 80	Microcápsulas	Os objetivos do estudo foram desenvolver uma técnica de microencapsulação que possibilite a entrega de carvacrol ao intestino delgado de suínos e avaliar a atividade antibacteriana das microcápsulas desenvolvidas contra <i>E. coli</i> K88, em experimentos que simulam os fluídos do trato gastrointestinal.	As microcápsulas desenvolvidas apresentaram alta eficiência de encapsulação (98%) e atividade antimicrobiana inalterada contra <i>Escherichia coli</i> K88. Além disso, as microcápsulas, em um modelo que imita o trato gastrointestinal, garantiram a efetiva liberação do carvacrol seletivamente no intestino delgado, impedindo assim sua liberação prematura ou perda completa no ambiente gástrico.	Wang et al., 2009
Quitosana	Nanopartícula	Avaliar a atividade antimicrobiana de nanopartículas de quitosana carregadas com carvacrol contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> e <i>Escherichia coli</i> e avaliar a cinética e o mecanismo de liberação de carvacrol das nanopartículas em diferentes valores de pH.	Os sistemas nanoparticulados exibiram capacidade de inibição para cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Bacillus cereus</i> com uma CIM de 0,257 mg/mL. Concentração semelhante foi obtida com carvacrol como uma molécula livre (CIM 0,250 mg/mL), sugerindo que o aprisionamento procedimento não interfere na atividade antimicrobiana.	Keawchaon; Yoksan, 2011
Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA)	Nanocápsula	Os autores investigaram o potencial das nanocápsulas de carvacrol contra biofilmes de <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	Os resultados demonstraram, no nível macroscópico, a capacidade de tais sistemas nanocarreadores de modificar as características viscoelásticas do biofilme em termos de elasticidade e deformação mecânica.	Iannitelli et al., 2011
Zeína	Nanopartícula	Este estudo teve por objetivo nanoencapsular carvacrol ou timol utilizando zeína para melhorar a	A eficiência de encapsulação dos ativos foi superior a 50%. O estudo demonstrou que o encapsulamento de do timol e do carvacrol em	Wu; Luo; Wang, 2012

Agente Encapsulante	Nanocarreador	Objetivo do Estudo	Resultados Reportados	Referência
		solubilidade dos ativos. O efeito de diferentes condições de pH na solubilidade, morfologia, estrutura, propriedade antioxidante e atividade antimicrobiana das nanopartículas também foram investigadas.	nanopartículas de zeína pode aumentar sua solubilidade em até 14 vezes sem prejudicar sua capacidade de eliminar radicais livres ou de controlar o crescimento de <i>E. coli</i> .	
Óleo de amendoim, lecitina de soja, polissorbato (Tween 20), monooleína e éster de açúcar	Nanoemulsão	Investigar a atividade antimicrobiana de de nanoemulsões contendo carvacrol, limoneno ou cinamaldeído contra <i>Escherichia coli</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	As nanoemulsões demonstraram uma difusividade significativamente aumentada o que promoveu uma ação antimicrobiana mais eficiente do que a do carvacrol na sua forma livre. E, ainda, duas nanoemulsões de carvacrol (CARV3 e CARV4) causaram a inativação completa (concentração abaixo do limite analítico de detecção de 1 UFC/mL) de <i>E. coli</i> e de <i>L. delbrueckii</i> após 2 horas de contato. Já a <i>S. cerevisiae</i> foi completamente inativada após 24 horas de contato.	Donsì et al., 2012
Tween 20, 40, 60, 80 e 85	Nanoemulsão	O objetivo do presente estudo foi investigar os principais fatores que influenciam as características físico-químicas das nanoemulsões. E, ainda, desenvolver um sistema de liberação com atividade antimicrobiana e alta estabilidade.	O tamanho médio das partículas variou com a composição da fase oleosa. O tipo de surfactante também teve um impacto apreciável no diâmetro médio das gotículas, sendo as partículas de menor tamanho formadas usando-se Tween. O tamanho das partículas também diminuiu (> 5000 para < 25 nm) à medida que a concentração total de surfactante foi aumentada (de 5 para 20%/p). A estabilidade das nanoemulsões diminuiu com o aumento da concentração de carvacrol na fase oleosa. Por outro lado, a eficácia antimicrobiana das nanoemulsões aumentou com o aumento da concentração de carvacrol.	Chang; McLandsborough; McClements, 2013

Agente Encapsulante	Nanocarreador	Objetivo do Estudo	Resultados Reportados	Referência
			Esses resultados sugerem que a concentração de óleo veicular deve ser cuidadosamente controlada para se obter boa estabilidade física e eficácia antimicrobiana.	
Poli-hidroxibuturato (PHB)	Nanopartícula	Formulações preparadas pelo método de nanoprecipitação (Car-PHB-NP) e diálise (Car-PHB-D) tiveram sua atividade antimicrobiana investigada contra <i>Escherichia coli</i> .	A Car-PHB-NP e a Car-PHB-D exibiram atividade antimicrobiana contra <i>Escherichia coli</i> . Além disso, ambas as formulações, asseguram uma melhor dispersão do fármaco aprisionado, apresentando maiores zonas de inibição (3,6 a 4,7 mm) do que o composto antimicrobiano livre (1,6 mm).	Shakeri; Shakeri; Hojjatoleslami, 2014
Zeína	Nanopartícula	Desenvolver pelo método de nanoprecipitação nanopartículas carregadas com timol e carvacrol revestidas de zeína e avaliar a atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, eficiência de encapsulação, liberação do princípio ativo e estabilidade durante o armazenamento.	Os autores demonstraram a estabilidade física e química das nanopartículas carregadas e sua atividade antimicrobiana contra <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> e <i>S. aureus</i> .	Rosa et al., 2015
Tween 80	Nanoemulsão	Neste estudo, a eficácia de uma nanoemulsão antimicrobiana de carvacrol foi testada contra sementes de brócolis e rabanete contaminadas por <i>Escherichia coli</i> O157: H7 e <i>Salmonella enterica</i> subespécie enterica serovar Enteritidis.	O tratamento das sementes de rabanete germinadas e testadas quanto à presença de <i>S. enteritidis</i> e <i>E. coli</i> , por 60 minutos na concentração de 4000 ppm (0,4%), inativou com sucesso os patógenos. Este método de tratamento não foi afetivo em sementes de brócolis contaminadas. A produção total de brotações não foi influenciada por nenhum tratamento. Os resultados demonstram que a nanoemulsão de carvacrol pode ser um método de tratamento alternativo para sementes de rabanete contaminadas.	Landry et al., 2015

Agente Encapsulante	Nanocarreador	Objetivo do Estudo	Resultados Reportados	Referência
β-ciclodextrina (β-CD)	Complexos de inclusão	Este estudo teve como objetivos: (1) preparar complexos de inclusão de carvacrol em β-CD utilizando os métodos de malaxagem e liofilização e caracterizar suas propriedades físico-químicas; (2) determinar a atividade antimicrobiana dos complexos de inclusão desenvolvidos contra <i>E. coli</i> K12 e <i>S. typhimurium</i> LT2; (3) determinar a atividade antioxidante e a estabilidade dos complexos de inclusão.	Os tamanhos dos complexos de inclusão foram de $441 \pm 12$ nm e $899 \pm 44$ nm e as eficiências de encapsulação foram de $83,79 \pm 2,89\%$ e $91,31 \pm 0,41\%$ para os complexos obtidos após malaxagem e liofilização, respectivamente. O complexo de inclusão obtido por malaxagem apresentou a menor atividade. Durante o período de armazenamento os complexos de inclusão permaneceram estáveis, não sendo degradados pela luz. Todos os complexos inibiram o crescimento da <i>Escherichia coli</i> K12 e da <i>Salmonella typhimurium</i> LT2 em concentrações mais baixas (valores variando de 300 a 350 mg/mL) em comparação ao carvacrol livre ( $\geq 1000$ mg/mL).	Santos et al., 2015
Twenn 80	Nanoemulsão	Os objetivos deste estudo foram desenvolver uma nanoemulsão de carvacrol estável e avaliar a atividade antimicrobiana, <i>in vitro</i> , da nanoemulsão de carvacrol combinada, ou não, com água eletrizada contra <i>Escherichia coli</i> , <i>Pichia pastoris</i> e microflora nativa em repolhos picados.	As nanopartículas apresentaram tamanho médio de $225,9 \pm 5,23$ nm. Testando a solução contendo nanoemulsão de carvacrol o crescimento de <i>E. coli</i> e de <i>P. pastoris</i> foi reduzido em 3 log CFU/mL em relação ao controle (água deionizada). Quando a nanoemulsão de carvacrol foi combinada com a água eletrizada, a redução de foi aumentada em 0,4 log e 0,6 log para <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i> , respectivamente. A adição de nanoemulsão branca também reduziu cerca de 0,3 log de ambos os microrganismos. Ao comparar o nível de inoculação inicial de <i>E. coli</i> (7 log CFU/mL) e <i>P. pastoris</i> (6 log CFU/mL), houve maior redução de células viáveis para <i>P. pastoris</i> (> 2 log redução) do que <i>E. coli</i> (<1 log redução) nos grupos de tratamento. A nanoemulsão de carvacrol	Sow et al., 2017

Agente Encapsulante	Nanocarreador	Objetivo do Estudo	Resultados Reportados	Referência
			apresentou efeito antimicrobiano sobre a microflora de repolhos e o uso combinado de nanoemulsão com a água eletrificada apresentou um efeito antimicrobiano mais forte e duradouro do que o observado pós tratamento com nanoemulsão de carvacrol.	
Fosfatidilcolina de soja (Lipoid S100)	Lipossoma	A atividade antimicrobiana de lipossomas carregados com timol e carvacrol foi investigada contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Salmonella enterica</i> aderidos a aço inoxidável ou em suspensão.	A CIM dos ativos livres e dos lipossomas contra <i>S. aureus</i> foi 0,662 mg/mL, enquanto que para <i>S. enterica</i> a CIM do timol e carvacrol foi de 0,331 mg/mL. A CIM dos lipossomas contra a <i>Salmonella</i> foi de 0,662 mg/mL. Os autores concluíram os lipossomas podem ser empregados em superfícies de contato com alimentos para prevenir a formação de biofilmes das bactérias testadas nos estágios iniciais da fixação.	Engel et al., 2017
Q-Naturale® ou Tween 80	Nanoemulsão	Desenvolver nanoemulsões antimicrobianas contendo carvacrol empregando um surfactante natural (extraído da casca da <i>Quillaja saponina</i> ) e avaliar a eficácia antimicrobiana das nanoemulsões de carvacrol determinando CIM contra um coquetel de três cepas de <i>Salmonella enterica</i> subspécie <i>enterica</i> .	A atividade antimicrobiana de nanoemulsões carvacrol formulada com Q-Naturale® foi maior do que as formuladas apenas com Tween 80. É possível que a presença do Q-Naturale® possa ter aumentado a permeabilidade das membranas celulares das bactérias, facilitando assim a entrada do carvacrol nas células de forma mais eficaz que o Tween 80.	Ryu et al., 2018
Fosfolipon 90H (PL 90H), sal sódico do 1, 2-dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosforilglicero (DMPG-Na)	Lipossoma	O objetivo deste estudo foi desenvolver e otimizar o encapsulamento do extrato de orégano turco ( <i>Origanum onites</i> L.). Também foi objetivo do estudo caracterizar os lipossomas quanto a eficiência	Testes de dissolução com o lipossoma otimizado revelaram que, aproximadamente, 99% do carvacrol encapsulado e 88% do ácido rosmarínico foram liberados. A eficiência de encapsulação do carvacrol variou de 40,23 ± 0,35% a 67,4 ± 0,56%. O tamanho médio das partículas foi de 234,3 nm e	Baranauskaite et al., 2018

Agente Encapsulante	Nanocarreador	Objetivo do Estudo	Resultados Reportados	Referência
		de encapsulação, perfil de liberação de carvacrol e ácido rosmarínico (ativos antimicrobianos majoritários), estabilidade do tamanho de partícula, polidispersividade, potencial zeta e morfologia. Os lipossomas sem ativo e extratos secos foram comparados aos lipossomas contendo ativo.	o potencial zeta foi de $-30,9$ mV para o lipossoma otimizado. O índice de polidispersão foi de $0,35$ indicando razoável distribuição no tamanho das partículas. O lipossoma contendo extrato de orégano turno demonstrou boa estabilidade durante 12 meses de armazenamento.	
$\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD)	Complexos de Inclusão	Os objetivos primários foram: (i) investigar os parâmetros experimentais que afetam a eficiência de encapsulação e o rendimento dos complexos de inclusão $\beta$ -CD com os agentes antimicrobianos naturais: timol, carvacrol e linalol, e (ii) produzir os complexos alvo que são adequados para aplicações de embalagem de alimentos sob um método de co-precipitação.	A sistemática de otimização das condições melhorou tanto o rendimento do complexo como a eficiência de encapsulação dos agentes antimicrobianos naturais em comparação com os métodos previamente relatados aplicados a outros agentes antimicrobianos. Usando uma proporção de 1:1 (molar) do agente antimicrobiano e da $\beta$ -CD, os parâmetros resultaram em rendimentos máximos de 87, 84 e 86% para timol, carvacrol e linalol respectivamente com uma eficiência de encapsulação próximo a 100% para cada agente.	Al-Nasiri et al., 2018

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

#### 4 ANTISSÉPTICOS E DESINFETANTES

A presença dos microrganismos no ambiente tem efeitos positivos e negativos à vida humana. Considerando-se a contaminação ambiental como fonte para a infecção, a higiene (limpeza e desinfecção) é medida fundamental para evitar que os microrganismos produzam efeitos indesejáveis sobre a saúde do homem ou ao ambiente (OLIVEIRA et al., 2017; AVANCINI; BOTH, 2017; BRASIL, 2007). Consoante a sua natureza, os processos de desinfecção podem ser físicos ou químicos. A desinfecção física utiliza o calor ou a radiação, enquanto

a desinfecção química considera o uso de produtos antimicrobianos de origem sintética, mineral ou natural (LIMA et al., 2017; TOZZETTI et al., 2009). Logo, a desinfecção é definida como o processo (físico ou químico) que elimina microrganismos patogênicos, com exceção de esporos, em superfícies inanimadas. A antisepsia tem a mesma finalidade, porém é procedimento executado sobre tecidos vivos (LIMA et al., 2017; AVANCINI; BOTH, 2017; OLIVEIRA et al., 2017; MASRI et al., 2013; WESSELS; INGMER, 2013). Para um processo de desinfecção eficaz é necessário levar em consideração uma série de fatores relacionados ao produto a ser utilizado (concentração e tempo de exposição, por exemplo); ao local onde será aplicado (limpeza prévia do objeto, presença de matéria orgânica, acesso do produto) e aos microrganismos presentes (carga microbiana, tipo de microrganismo) (PINHEIRO et al., 2015; MASRI et al., 2013; CASTELANOS; JOUCLAS, 1974). Os antissépticos são formulações com função de eliminar ou inibir o crescimento de microrganismos quando aplicados sobre a pele ou mucosas (MASRI et al., 2013; REIS et al., 2011; WIJESINGHE; WEERASINDHE, 2010; ANDRADE; ARAGÃO; FURLAN, 2009; McDONNELL; RUSSEL, 1999). Estes podem ser classificados como bactericidas quando possuem a capacidade de destruir as bactérias nas formas vegetativas, ou como agentes bacteriostáticos quando inibem o crescimento do microrganismo sem destruí-lo. Uma característica desejável a ser acrescida aos antissépticos é a atividade residual, ou seja, atividade química persistente sobre a pele (REIS et al., 2011).

Os desinfetantes, por sua vez, são agentes químicos que destroem microrganismos patogênicos em objetos e superfícies inanimadas (OLIVEIRA et al., 2017; MASRI et al., 2013; WESSELS; INGMER, 2013; ANDRADE; ARAGÃO; FURLAN, 2009; BRASIL, 2007; McDONNELL; RUSSEL, 1999). Os desinfetantes podem ser esporostáticos, mas não necessariamente esporocidas (OLIVEIRA et al., 2017; WIJESINGHE; WEERASINDHE, 2010; McDONNELL; RUSSEL, 1999). Os desinfetantes têm largo espectro de atividade antimicrobiana podendo ser utilizados em várias locais, incluindo a indústria de processamento de alimentos, bebidas, farmacêutica e médico-hospitalar (REIS et al., 2011). Nesse contexto, entende-se por agentes ou produtos antimicrobianos substâncias químicas que matam ou inibem o crescimento de microrganismos na forma vegetativa, nos diferentes locais onde podem ser encontrados, i.e., tecidos vivos ou superfícies inanimadas (ANDRADE; ARAGÃO; FURLAN, 2009). Cabe ressaltar também que o termo biocida é cada vez mais usado para

agentes químicos com atividade antisséptica, desinfetante ou, às vezes, conservante. Um agente químico pode apresentar uma, duas ou mesmo todas essas atividades (RUSSEL, 2002). Biocida é, então, um termo geral que descreve um agente químico, geralmente de amplo espectro, que inativa microrganismos (McDONNELL; RUSSEL, 1999).

Os produtos com ação antimicrobiana podem ser classificados por âmbito de aplicação como de uso geral, uso hospitalar, em indústria alimentícia e afins, de uso específico, ou ainda de uso em objetos e ambientes relacionados à assistência à saúde para artigos críticos e semicríticos. Os produtos com ação antimicrobiana de uso geral abrangem os produtos de uso doméstico, institucional ou industrial, destinados à aplicação sobre objetos, superfícies inanimadas e ambientes. Estes, por sua vez, são classificados em desodorizantes (produtos que têm em sua composição substância com atividade antimicrobiana capaz de controlar odores desagradáveis), sanitizantes (agentes/produtos que reduzem o número de microrganismos críticos para saúde pública em níveis considerados seguros com base em parâmetros estabelecidos) e desinfetantes (BRASIL, 2007; BRASIL, 2010). Assim, o processo de sanitização também está relacionado à condição de desinfecção sem, no entanto, destruir ou inativar irreversivelmente as bactérias (OLIVEIRA et al., 2017).

Um agente químico antimicrobiano ideal deve apresentar algumas características consideradas extremamente relevantes para o uso e aplicação como um desinfetante. Entre elas pode-se citar:

- demonstrar amplo espectro de ação em baixas concentrações;
- apresentar rápida inativação dos microrganismos;
- ser ativo na presença de matéria orgânica;
- baixa toxicidade e não deve ser irritante ao usuário;
- possuir atividade em temperaturas ambiente ou corporal;
- ter tolerância à variação de pH e radiação luminosa;
- ser estável à temperatura ambiente por um período razoável tanto em concentração original ou quando diluídos;
- ser compatível com sabões, detergentes e outros produtos químicos;
- não apresentar ação tintorial e corrosivos em superfícies metálicas
- ser compatível com diversos tipos de materiais, não causando danos a borrachas, plásticos e outros;
- ter alta solubilidade, principalmente em água, por ser o veículo mais comumente utilizado;
- ser inodoro, ou de odor agradável;

- apresentar facilidade de aquisição, preparo e aplicação;
- baixo custo;
- expressar ação residual sem ser poluente (OLIVEIRA et al., 2017; PINHEIRO et al., 2015; ANDRADE; ARAGÃO; FURLAN, 2009; TOZZETTI et al., 2009; McDONNELL; RUSSEL, 1999; CASTELANOS; JOUCLAS, 1974).

No mercado há uma infinidade de produtos com diferentes agentes químicos antimicrobianos usados como antissépticos e/ou desinfetantes. Dependendo da natureza química do agente antimicrobiano, estes podem ser categorizados em vários grupos (WIJESINGHE; WEERASINDHE, 2010; REIS et al., 2011). A classificação química de alguns desinfetantes e antissépticos disponíveis comercialmente é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação química de desinfetantes e antissépticos disponíveis comercialmente.

<b>Grupo Químico</b>	<b>Antissépticos/Desinfetantes</b>
Álcoois	Etanol Isopropanol
Fenóis	Fenol Cresol Fenóis Halogenados
Aldeídos	Formaldeído ou formol Glutaraldeído
Halogênios e seus derivados	Compostos de iodo Compostos de cloro
Biguanidas	Clorexidina
Peroxigênios	Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) Ozônio Ácido peracético
Compostos Quaternários de Amônio (QACs)	Cetrimida Cloro de benzalcônio

Fonte: Adaptado de Russel (2003); McDonnell; Russell (1999).

Os mecanismos de ação através dos quais os agentes antimicrobianos afetam a viabilidade dos microrganismos são objetos de

diversos estudos. O modo de ação dos desinfetantes e antissépticos difere grandemente de acordo com a substância química presente (REIS et al., 2011; WIJESINGHE; WEERASINDHE, 2010). De interesse a este trabalho, estudos apontam que o álcool etílico atua principalmente causando danos à membrana celular e rápida desnaturação proteica, com subsequente interferência no metabolismo e lise celular. Claramente, o mecanismo de ação do glutaraldeído envolve uma forte associação com as camadas externas de células bacterianas causando danos irreversíveis, compromete a função de diversas enzimas celulares e, ainda, promove a inibição da síntese dos ácidos nucleicos e de proteínas. Os compostos de cloro são agentes oxidantes altamente ativos que afetam a síntese de DNA, a atividade celular das proteínas e a respiração celular. O iodo penetra rapidamente nos microorganismos e ataca grupos-chave de proteínas, nucleotídeos e ácidos graxos, o que culmina na morte celular. O peróxido de hidrogênio age como um oxidante, liberando radicais livres que afetam componentes celulares, incluindo lipídeos, proteínas e DNA; já os compostos quaternários de amônio são agentes ativos na membrana, principalmente na membrana citoplasmática interna. Os agentes antimicrobianos do tipo fenólico têm sido usados há muito tempo por suas propriedades antisséptica, desinfetante ou conservante, dependendo do composto. Sabe-se que eles agem aumentando a permeabilidade das membranas celulares e citoplasmáticas induzindo o extravasamento progressivo de constituintes intracelulares (MASRI et al., 2013; WESSELS; INGMER, 2013; MAILLARD, 2002; McDONNELL; RUSSELL, 1999).

Se, por um lado, existe significativa quantidade de estudos sobre os mecanismos de resistência bacteriana à ação dos antibióticos, por outro, a investigação verificando a suscetibilidade destes organismos frente à atividade dos desinfetantes ainda é pouco relatada na literatura (HARBARTH et al., 2014; WESSELS; INGMER, 2013). Harbath e colaboradores (2014), em revisão sistemática da literatura, relataram 12 estudos descrevendo a sobrevivência bacteriana após o uso de antissépticos em diversas concentrações. No entanto, apenas 6 estudos descritos investigaram se bactérias resistentes a antibióticos são menos sensíveis a desinfetantes nas condições e concentrações recomendadas pelos fabricantes, comparativamente àquelas sensíveis. O estudo realizado pelo *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks* - SCENIHR (SCENIHR, 2009) também observou a ausência de dados quantitativos sobre alterações da população microbiana após exposição a biocidas, nas concentrações residuais ou de uso. Este estudo alertou para o fato de que os biocidas disseminados no

ambiente podem representar um risco biológico através da resistência obtida após pressão seletiva devido à transferência horizontal de genes e sobreposição da regulação genética. Recentemente, foi demonstrada, *in vitro*, que uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resistente à ciprofloxacina teve a sensibilidade ao cloreto de benzalcônio reduzida em 12 vezes. Embora a seleção da cepa resistente tenha sido resultado da exposição contínua a baixas concentrações de antisséptico ou antibiótico *in vitro*, é uma demonstração convincente que variantes adaptadas podem ser selecionadas após exposição contínua a concentrações sub-inibitórias de biocidas, enfatizando as implicações potenciais do uso contínuo em larga escala de compostos de amônio quaternário (McCAY; OCAMPO-SOSA; FLEMING, 2010). O risco de desenvolvimento de resistência a biocidas tem sido um ponto de grande preocupação para a Comissão Europeia há mais de uma década. De fato, a literatura científica já traz relatos de resistência a substâncias ativas desinfetantes (DAVIES; DAVIES, 2010; RUSSEL, 2003; McDONNELL; RUSSELL, 1999).

A terminologia relativa à ação e resistência a antibióticos é bem compreendida, entretanto, a terminologia relacionada à atividade de agentes biocidas e especialmente à resistência a agentes químicos desinfetantes ainda é objeto de debate. Os termos utilizados para descrever a diminuição da suscetibilidade a biocidas em cultura de laboratório incluem: "insusceptibilidade", "suscetibilidade reduzida", "tolerância" e "tolerante" (RUSSEL, 2003). A suscetibilidade microbiana aos antissépticos e desinfetantes varia conforme os diferentes tipos de microrganismos, uma vez que cada microrganismo responde diferentemente os agentes biocidas, dependendo de sua estrutura celular, composição e fisiologia. Como as espécies de microrganismos reagem de maneira diferente, é conveniente considerar a suscetibilidade das bactérias, fungos, vírus, protozoários e *prions* aos agentes antimicrobianos, separadamente (McDONNELL; RUSSELL, 1999). Entretanto, independente do tipo de microrganismo, o processo de desenvolvimento da suscetibilidade microbiana aos antissépticos e desinfetantes, quer seja pelo aumento da tolerância, por resistência intrínseca (inata ao microrganismo e controlada cromossomicamente), ou adquirida (mutação genética), o resultado é único, i.e., o desenvolvimento da resistência a um composto pode ser acompanhado pelo aparecimento de resistência a um segundo composto. Também há evidências de ocorrência de resistência cruzada, a qual se dá quando agentes antimicrobianos (grupos antibióticos e compostos desinfetantes, por exemplo) atacam o mesmo alvo, iniciando uma via comum de morte celular, ou compartilham uma rota comum de acesso a suas respectivas

metas (AVANCINI; BOTH, 2017; DAVIES; DAVIES, 2010; McDONNELL; RUSSELL, 1999). A resistência intrínseca pode ser observada em bactérias Gram-negativas, esporos bacterianos, micobactérias e, em certas condições, por estafilococos. Em bactérias Gram-negativas a membrana externa pode representar uma barreira que impede a absorção de antissépticos ou desinfetantes e, portanto, tendem a ser mais resistentes do que os organismos Gram-positivos. Nas micobactérias a parede celular cerosa pode impedir a adequada entrada dos biocidas. Em bactérias Gram-positivas a presença do glicocálice pode estar associada à redução da difusão de antissépticos (McDONNELL; RUSSELL, 1999).

Em relação ao uso de desinfetantes à destruição de biofilmes bacterianos, os problemas de resistência microbiana são exacerbados, uma vez que para o sucesso dos processos de desinfecção das superfícies são necessárias maiores concentrações de desinfetantes, ou aumento do tempo de contato (CAMPANA; BAFFONE, 2018; OLIVEIRA et al., 2017; RUSSEL 2003). De fato, Bae, Baek e Lee (2012) relataram que biofilmes bacterianos podem sobreviver a tratamentos desinfetantes, contendo hipoclorito de sódio, sais de amônio quaternário, compostos fenólicos e peróxido de hidrogênio, evidenciando uma suscetibilidade decrescente ao arsenal químico disponível comercialmente e correntemente utilizado. Por estas razões, a prevenção da formação de biofilme requer procedimentos de limpeza e desinfecção regulares das superfícies para impedir a fixação bacteriana e o desenvolvimento do biofilme (CAMPANA; BAFFONE, 2018).

Tendo em vista o contínuo aumento da resistência bacteriana aos antibióticos, o grande e crescente uso de biocidas, os relatos de suscetibilidade microbiana aos antissépticos e de sobrevivência de biofilmes a tratamentos desinfetantes, assume-se que o desenvolvimento e a aplicação de novas estratégias eficazes de desinfecção constituem demandas relevantes à saúde humana e animal, eventualmente com importantes consequências ambientais. Um desinfetante adequado deve ser seguro para os consumidores e também inócuo ao ambiente. Neste contexto, os óleos essenciais e seus compostos ativos constituem uma alternativa potencial para uso como substituintes ou em complementariedade aos desinfetantes tradicionais (CAMPANA; BAFFONE, 2018). Os baixos níveis de resistência antimicrobiana associado aos óleos essenciais podem estar relacionados ao fato de que essas substâncias não atacam um único alvo específico, mas apresentam múltiplos modos de ação antibacteriana (GARCÍA-SALINAS, 2018).

Campana e Baffone (2018) confirmaram que o tratamento com

carvacrol (15 min) de biofilmes de *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* desenvolvidos em aço inoxidável, foi eficaz, inibindo o crescimento microbiano. Campana e colaboradores (2017) observaram atividade de óleos essenciais (*Cinnamomum cassia* e *Salvia officinalis*) microemulsionados contra biofilmes *Staphylococcus aureus* desenvolvidos em superfície de aço inoxidável.

#### 4.1 Métodos para avaliação da ação desinfetante

No Brasil, novos produtos desinfetantes somente são registrados e autorizados para uso mediante a comprovação de sua eficácia, através de análises realizadas com o produto final nas diluições, tempos de contato e condições de uso indicadas (BRASIL, 2010). Segundo a RDC N<sup>o</sup>. 14 de 28 de fevereiro de 2007 e a RDC N<sup>o</sup>. 35 de 16 de agosto de 2010, a comprovação da eficácia, ou seja, a avaliação da atividade antimicrobiana de novos produtos desinfetantes, deve ser realizada mediante a metodologia da AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), ou métodos adotados pelo CEN (Comitê Europeu de Normatização). Essas análises podem ser realizadas no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Ministério da Saúde), ou em laboratórios oficiais credenciados, obedecendo aos métodos da AOAC ou métodos adotados pelo CEN (REIS et al., 2011). Para a análise de eficácia dos desinfetantes de uso geral, a metodologia preconizada pela AOAC é o método da Diluição de Uso (DU) (PINHEIRO et al., 2015; TOMASINO, 2013). A Norma Européia (EN) 1040:2005 do CEN descreve as metodologias preliminares à avaliação da eficácia básica de substâncias ativas e de produtos em desenvolvimento para os quais ainda não foram especificadas áreas de aplicação. Já, a EN 14885:2015 descreve as demais metodologias empregadas para testar a atividade antimicrobiana de produtos antissépticos ou desinfetantes, em uso ou em desenvolvimento, complementares e específicas a cada uma das três áreas de aplicação a que se destina o produto, e.g., área médica, veterinária, alimentícia, industrial, doméstica e institucional (EUROPEAN STANDARD 14885:2015; EUROPEAN STANDARD 1040:2005).

##### 4.1.1 Método da Diluição de Uso

O método da Diluição de Uso (DU) da AOAC baseia-se na

utilização de cilindros de aço inox, como suporte para simular uma superfície inanimada não porosa, impregnados com microrganismos de referência. Esses cilindros são expostos ao desinfetante a ser testado, de acordo com a diluição e o tempo de contato recomendados pelo próprio fabricante, respeitada a legislação vigente e a classificação do produto. Em seguida, os cilindros são transferidos para meios de cultura para verificação de possíveis microrganismos sobreviventes. Após a incubação, é avaliada a presença ou ausência de crescimento microbiano nas subculturas através da turvação do meio. Para ser aprovado, o produto deve eliminar os microrganismos em 59 dos 60 cilindros utilizados em cada teste (PINHEIRO et al., 2015; TOMASINO, 2013, INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2011; INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009). Entretanto, apesar de ser o método oficialmente adotado pela AOAC e pelos órgãos brasileiros responsáveis, o método da DU apresentava algumas falhas como, por exemplo, a falta de padronização do número de células microbianas nos cilindros carreadores. A padronização do número de células por cilindro no início do método e a avaliação do número de células ao final da análise conferiria um caráter quantitativo ao método da DU (PINHEIRO et al., 2015).

Assim, em 2012, a AOAC introduziu uma etapa que remete à contagem das bactérias viáveis nos cilindros carreadores como um controle adicional do ensaio (mínimo de 6  $\log_{10}$  de células viáveis/cilindro e máximo de 7  $\log_{10}$  de células viáveis/cilindro) (PINHEIRO et al., 2015; TOMASINO, 2013). Nessa etapa, um cilindro contaminado e seco, escolhido aleatoriamente, é adicionado a um tubo contendo caldo Lethéen. Esse tubo com o cilindro é submetido à sonicação e, após agitação, alíquotas são retiradas, diluídas e plaqueadas para a contagem das células viáveis (PINHEIRO et al., 2015). Dispondo-se da densidade microbiana inicial inoculada nos cilindros é possível estimar a redução logarítmica (RL) após a exposição dos microrganismos aos produtos em teste. Como resultado das modificações realizadas, o método da DU pode ser caracterizado como um procedimento “semi-quantitativo”, permitindo análises estatísticas adicionais e maior segurança à interpretação dos resultados (TOMASINO, 2013).

#### 4.1.2 Método da neutralização

Há um amplo consenso na Europa de que a avaliação de um

desinfetante deve incluir vários testes. Por isso, no método adotado pelo CEN, o princípio básico é que a eficiência antimicrobiana de um desinfetante ou antisséptico seja avaliada em três etapas. Ao longo desses testes, os produtos são avaliados quanto à capacidade de eliminar os microrganismos em suspensão, na presença de substâncias interferentes e em superfície empregando discos de aço inox (PINHEIRO et al., 2015; EUROPEAN STANDARD 14885:2015; WIJESINGHE; WEERASINGHE, 2010; EUROPEAN STANDARD 1040:2005; PITTEN; WERNER; KRAMER, 2003).

A primeira etapa (fase 1 - ensaios de suspensão) refere-se a testes laboratoriais nos quais se determina a atividade antimicrobiana básica de um agente químico ou produto candidato a desinfetante (WIJESINGHE; WEERASINGHE, 2010; PITTEN, WERNER, KRAMER, 2003). A fase 1 objetiva gerar um resultado preliminar sobre o produto teste, sendo utilizada, principalmente, pelas próprias indústrias produtoras para ajuste da concentração do princípio ativo e características do produto em desenvolvimento (PINHEIRO et al., 2015; LANGSRUD; SUNDHEIM, 1998).

O método de diluição/neutralização, especificado na norma EN 1040:2005, trata de um ensaio *in vitro* de suspensão quantitativo (fase 1) que permite determinar se um desinfetante químico ou antisséptico tem ou não atividade bactericida básica nos campos descritos no escopo da norma. Todas as etapas do método são realizadas a partir de um inóculo inicial padronizado, sendo obtido um número final de células viáveis após um tempo padronizado de exposição ao produto teste, o que confere um viés quantitativo à análise da ação antimicrobiana do produto de interesse (PINHEIRO et al., 2015). Seu caráter quantitativo permite análises estatísticas adicionais e comparações de resultados entre experimentos intra ou interlaboratórios (EUROPEAN STANDARD 1040:2005; ALCÁNTARA; RODRÍGUEZ; VARGAS, 2001; LANGSRUD; SUNDHEIM, 1998). Invariavelmente, os testes de suspensão são relativamente simples de realizar em comparação com testes de superfície e com os “testes de campo” (ensaios clínicos). A eventual falta de reprodutibilidade dos testes de suspensão bactericida tem sido, geralmente, atribuída à falta de padronização do inóculo microbiano inicial usado, à neutralização insuficiente do composto, ou ao método de contagem de colônias (LANGSRUD; SUNDHEIM, 1998).

A neutralização é uma etapa de grande importância na metodologia do CEN, porque sem ela o produto agiria por mais tempo do que o recomendado, podendo gerar resultados falso positivos

(PINHEIRO et al., 2015). Nos estudos iniciais do efeito biocida dos desinfetantes, a sua eficácia é frequentemente sobrestimada devido à fraca ou nula neutralização do desinfetante após a exposição (LANGSRUD; SUNDHEIM, 1998). Por isso, a definição do tempo de neutralização e da concentração e/ou composição do neutralizante é essencial para o sucesso da metodologia preconizada pelo CEN (PINHEIRO et al., 2015). A seleção da solução neutralizante precisa levar em consideração não apenas o produto a ser testado, mas também o microrganismo envolvido, de forma a não deixar nenhum resíduo que possa afetar a viabilidade das bactérias e inviabilizar o ensaio. Portanto, tanto a toxicidade quanto a capacidade de neutralizar o biocida devem ser avaliadas nas mesmas condições experimentais (PINHEIRO et al., 2015; LANGSRUD; SUNDHEIM, 1998). O método do CEN para testar o efeito bactericida de desinfetantes inclui esses controles (controle de neutralização do biocida e controle de toxicidade do neutralizante), além do controle das condições em que o experimento é conduzido.

Desinfetantes e antissépticos representando os grupos fenólicos solúveis (Dettol<sup>®</sup>), compostos de amônio quaternário (Lysol<sup>®</sup>) e halogênio (Chlorox<sup>®</sup>) foram avaliados por Wijesinghe e Weerasinghe (2010) quanto à atividade bactericida básica, usando a fase 1 do protocolo europeu EN 1040:1997, contra cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). Os produtos foram testados a 50% de concentração, 2 vezes a diluição recomendada, na diluição recomendada em rótulo e a 0,5 vezes a diluição recomendada, nos tempos de contato de 1, 5 e 15 min. Com um minuto de contato nenhum dos produtos alcançou uma redução de 5 log (redução mínima exigida pela Norma) contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Para as diluições de uso, recomendadas nos rótulos dos produtos, somente o Chlorox<sup>®</sup> alcançou um efeito microbicida contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, após cinco minutos de contato.

Os ensaios de fase 2 (ensaios de suspensão) - etapa 1 diferem da fase 1 pois incluem a adição de substância interferente (e.g., proteínas). A substância interferente é utilizada para mimetizar a matéria orgânica encontrada nas superfícies do ambiente, com o objetivo de se aproximar da realidade do processo de desinfecção (PINHEIRO et al., 2015). Estes testes são definidos, principalmente, para produtos de higiene das mãos, desinfetantes de superfície, ou desinfetantes de instrumentos (EUROPEAN STANDARD 1276:2015; PITTEN; WERNER; KRAMER, 2003; EUROPEAN STANDARD 1040:2005).

A fase 2 - etapa 2 (testes em superfície) compreende ensaios que simulam condições reais com a utilização de discos de aço inox impregnados com microrganismos. Os microrganismos são fixados nos discos de aço inox na presença de uma substância orgânica como, por exemplo, albumina de soro bovino e objetivam avaliar o comportamento e a eficácia do produto em uma superfície semelhante aquela onde poderá ser utilizado (PINHEIRO et al., 2015; EUROPEAN STANDARD 14885: 2015; EUROPEAN STANDARD 13697:2015).

Os testes de fase 2 - etapa 2 são de maior importância, pois alguns produtos apesar de não atenderem completamente aos requisitos exigidos pelos testes de fase 1 ou fase 2 - etapa 1 ainda podem ter sua eficácia comprovada se atenderem aos requisitos exigidos no teste da fase 2 - etapa 2 (PITTEN; WERNER; KRAMER, 2003). Os testes de fase 3 incluem testes de campo ou testes clínicos, no entanto, ainda não está claro para quais produtos estes serão definidos (PITTEN; WERNER; KRAMER, 2003). Dessa forma, os desinfetantes podem ser analisados em diferentes situações e em condições simuladas que se aproximam um pouco mais da realidade, o que pode tornar a avaliação mais precisa em relação à situação real de uso dos produtos (PINHEIRO et al., 2015).

## **CAPÍTULO 2: NANOEMULSÕES DE CARVACROL**

---



As características físico-químicas das nanoemulsões são afetadas por diversas variáveis que incluem não somente a concentração e a solubilidade da substância ativa, mas também a natureza do solvente orgânico, tipo e concentração do tensoativo, bem como o método de preparação (SAVARDEKAR; BAJAJ, 2016; MANGALE et al., 2015; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). Assim, a composição qualitativa e a técnica utilizada no desenvolvimento dos sistemas coloidais são fatores que influenciam diretamente o tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta, modificando as suas características físico-químicas (BRUXEL et al., 2012). Para o desenvolvimento de um sistema nanoestruturado adequado à encapsulação de um composto hidrofóbico, como o carvacrol, fez-se necessário um estudo de formulação para avaliar a influência destes fatores. Frente ao exposto, a primeira parte deste capítulo descreve os materiais e métodos empregados no desenvolvimento e na caracterização das nanoemulsões de carvacrol bem como, aborda os resultados alcançados pela otimização das condições de preparação das formulações. As nanoemulsões foram desenvolvidas empregando-se duas abordagens da técnica de emulsificação espontânea: a técnica de deslocamento do solvente, utilizando o etanol como solvente orgânico e a de emulsificação espontânea livre de solvente (auto-nanoemulsificação). As nanopartículas formadas foram estabilizadas com auxílio dos surfactantes tween, poloxamer e lecitina e caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e morfologia.

Nos estudos de estabilidade realizados com nanoemulsões, as formulações são armazenadas sob refrigeração (8°C) e à temperatura ambiente (25°C) durante vários meses. O tamanho médio de partícula, o PZ, o PDI e o pH são as variáveis físico-químicas utilizadas, periodicamente, para monitor a estabilidade das suspensões coloidais durante o armazenamento (RYU et al., 2018; HALNOR et al., 2018; SAVARDEKAR; BAJAJ, 2016; LOVELYN, ATTAMA, 2011; SCHAFFAZICK et al., 2003). Além de alterações como o aumento do tamanho das gotículas e variações bruscas nos valores de potencial zeta, a redução do pH também relaciona-se a fenômenos de instabilidade dos sistemas nanoestruturados (BRUXEL et al., 2012). Assim, segunda parte do capítulo aborda os resultados obtidos após a avaliação da estabilidade das formulações desenvolvidas, tanto pela técnica de deslocamento do solvente quanto por auto-nanoemulsificação, quando armazenadas durante 120 dias, sob refrigeração (8°C) e à temperatura ambiente (25°C). As propriedades físico-químicas (o tamanho médio de

partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH) foram monitoradas, em tempos pré-estabelecidos.

Tendo em vista as características físico-químicas satisfatórias do sistema, estabilidade durante o armazenamento em temperatura ambiente e praticidade da técnica de preparação, ausência de solvente orgânico durante o preparo, a nanoemulsão desenvolvida com o surfactante poloxamer, pelo método de auto-nanoemulsificação foi selecionada para os experimentos posteriores. Sendo assim, a partir desta nanoemulsão de carvacrol (NC) o teor e a eficiência de encapsulação foram avaliados, após a validação de um método analítico quantitativo por espectrofotometria de UV-Vis, em formulações recém preparadas e após 60 dias de armazenamento, à temperatura ambiente. A validação do método analítico utilizado na determinação do teor de carvacrol encapsulado encontra-se descrita no Apêndice A e os resultados serão submetidos para publicação em periódico.

A determinação da Eficiência de Encapsulação (EE) de ativos é de grande importância, por revelar a eficiência do processo de nanoencapsulação, mensurando a quantidade de ativo disponível nos sistemas de liberação (KOTRONIA et al., 2017). A EE é definida como a porcentagem de ativo encapsulado no interior das nanopartículas, ou associada à superfície. De acordo com a solubilidade do composto de interesse, um percentual de ativo pode permanecer disperso ou dissolvido na aquosa (teor de ativo residual), reduzindo a quantidade encapsulada e, por conseguinte a EE (SOKOLIK et al., 2018). Outros fatores também podem influenciar a quantidade de ativo associada aos sistemas nanoestruturados como, por exemplo, o pH do meio, as características de carga elétrica da superfície das partículas, a quantidade de ativo adicionada à formulação, a ordem de adição do ativo na formulação, ou seja, antes (incorporação) ou após (incubação) à formação das nanoestruturas, a natureza do óleo utilizado e, ainda, o tipo de tensoativo adsorvido à superfície polimérica. Nos estudos de EE, uma técnica de separação bastante utilizada é a ultrafiltração-centrifugação, na qual uma membrana é usada para separar a fase aquosa dispersante da suspensão coloidal. A concentração livre da substância ativa é determinada no ultrafiltrado e a fração de ativo associada às nanoestruturas é calculada pela subtração das concentrações total adicionado e livre (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Neste capítulo também são apresentados os resultados dos estudos *in vitro* de atividades citotóxica e de atividade antimicrobiana da NC e do ativo livre. Nos últimos anos, tem sido descrita a ação antimicrobiana do carvacrol e/ou dos óleos essenciais que contém este

ativo como um dos componentes majoritários (CAMPANA et al., 2017; ENGEL et al., 2017; NOSTRO et al., 2007). A natureza hidrofóbica dos compostos fenólicos, como o timol e o carvacrol, pode explicar suas interações com as biomembranas e, portanto, sua atividade antimicrobiana. O envelope externo e a membrana citoplasmática interna das bactérias são considerados os principais locais de ação do carvacrol (MARINELLI; STEFANO; CACCIOATORE, 2018; LIOLIOS et al., 2009; NOSTRO et al., 2007). Estudos têm demonstrado que a atividade antimicrobiana do carvacrol pode ser explicada pela interação da molécula com os componentes da membrana fosfolipídica dos microrganismos resultando em mudanças na estrutura da membrana. A desestabilização da membrana resulta na sua expansão, com consequente, aumento da fluidez que, por sua vez, causa aumento da permeabilidade passiva levando: a) a perda de componentes intracelulares; b) ao comprometimento do metabolismo energético, e c) ao comprometimento da síntese do material genético (MARINELLI; STEFANO; CACCIOATORE, 2018; GARCÍA-SALINAS et al., 2018; PRAKASH et al., 2018; RYU et al., 2018; OUAZZOU et al., 2012; NOSTRO; PAPALIA, 2012; KEAWCHAOON; YOKSAN, 2011; LIOLIOS et al., 2009; ULTEE et al., 2000). O grupamento hidroxila tem sido apontado como o principal responsável pelas trocas iônicas trans-membrana que perturbam o balanço de cátions nas células bacterianas. Ademais, a presença do grupo hidroxila do carvacrol parece estar relacionada à inativação das enzimas microbianas (MARINELLI; STEFANO; CACCIOATORE, 2018; GARCÍA-SALINAS et al., 2018; NOSTRO; PAPALIA, 2012; LIOLIOS et al., 2009; VELDHUIZEN et al., 2006).

Apesar do carvacrol ser um eficaz antibacteriano, sua aplicação tem sido limitada. Isso ocorre devido à alta volatilidade, baixa solubilidade em água e facilidade de degradação durante processamento (MARINELLI; STEFANO; CACCIOATORE, 2018; SYED; SARKAR, 2018; LIOLIOS et al., 2009). Além disso, o carvacrol também pode interagir com moléculas lipofílicas, como lipídios e proteínas. Essas interações reduzem a concentração efetiva de carvacrol, afetando negativamente sua eficácia antimicrobiana (SYED; SARKAR, 2018). O nanoencapsulamento foi a estratégia empregada neste estudo para superar as limitações da aplicação do carvacrol como antimicrobiano. O processo de emulsificação espontânea desenvolvido, sem a utilização de qualquer tipo de solvente orgânico, permitiu a dispersão do carvacrol em fase aquosa, na forma de nanopartículas carregadas de ativo. Nesta forma dispersível em água a atividade antimicrobiana, contra as cepas de *S. aureus* (ATCC 6538), *S. typhimurium* (ATCC 14028) e *P. aeruginosa*

(ATCC 15442), foi preliminarmente avaliada, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), pela técnica de microdiluição em caldo, conforme a norma M7-A7 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006), com adaptações (CLS, 2006).

Bae, Baek e Lee (2012) evidenciaram uma diminuição da suscetibilidade dos biofilmes bacterianos a desinfetantes químicos líquidos, como o hipoclorito de sódio, os sais de amônio quaternário, os desinfetantes fenólicos, o peróxido de hidrogênio e íons de prata. O aumento da resistência a desinfetantes e agentes sanitizantes pode contribuir para a ineficácia dos sistemas de limpeza no local desejado e, para isso, maiores concentrações de desinfetantes e/ou maior tempo de contato são necessários para se obter a descontaminação de superfícies inanimadas (CAMPANA; BAFFONE, 2018). Todas essas razões levam à busca de novos compostos com ação bacteriostática e/ou bactericida, bem como ao desenvolvimento e avaliação de produtos formulados a partir destes. Entretanto, a natureza hidrofóbica do carvacrol representa um desafio a sua utilização também como um desinfetante ou antisséptico em meio aquoso. A rápida volatilização ou degradação do ativo livre, após exposição ao calor, também limita seu emprego como sanitizante ou desinfetante de superfícies não porosas inanimadas. A utilização de alguns solventes orgânicos, como o etanol ou o isopropanol, como veículos para o carvacrol parece ser razoável. No entanto, o risco de usar solventes irritantes à pele deve ser considerado. Além disso, existe um apelo global para minimizar o uso de solventes e reduzir contaminação ambiental (SHAABAN; EDRIS, 2015). Como a análise da efetividade de um agente químico utilizado como desinfetante deve iniciar com experimentações *in vitro* (REIS et al., 2011), neste estudo, a atividade bactericida da NC foi determinada utilizando-se o método de diluição/neutralização. Trata-se de um “Teste de Suspensão Quantitativo para Avaliar a Atividade Bactericida de Desinfetantes e Antissépticos Químicos (fase 1)” descrito na Norma Européia (EN) 1040:2005 do protocolo do Comitê Europeu de Padronização (CEN) (EUROPEAN STANDARD 1040:2005). A adoção do protocolo europeu está relacionada ao fato de que o teste de suspensão permite acompanhar a redução ou a inativação da densidade populacional inicial, de forma quantitativa (em escala logarítmica), ao longo dos tempos de contato com a solução antimicrobiana (MACIEL et al., 2017).

O método de diluição/neutralização, descrito na EN 1040:2005, inclui as etapas de preparação da suspensão bacteriana, de exposição da suspensão bacteriana ao produto desinfetante em teste, seguida das etapas de neutralização do componente bactericida e da estimativa do

número de células sobreviventes. Neste sentido, é necessária a realização de ensaios destinados ao controle e validação das diferentes etapas do teste de suspensão empregado (EUROPEAN STANDARD 1040:2005). Neste estudo foram conduzidos ensaios controle para investigar a ausência de qualquer efeito letal das condições experimentais, sendo conduzidos na ausência do produto desinfetante em teste. Como o método de diluição/neutralização da EN 1040:2005 requer o uso de neutralizantes que atuam inativando os resíduos da substância antimicrobiana, após os tempos de contato da solução antimicrobiana com o inóculo microbiano também foi necessário a realização de um ensaio controle para verificar a ausência de toxicidade do neutralizante e se excluir a possibilidade de ocorrência de um efeito antimicrobiano devido a toxicidade intrínseca ao agente neutralizante. A total neutralização dos compostos ou produtos desinfetantes é muito importante para excluir a possibilidade de resultados que superestimem a eficácia do desinfetante em teste, devido a uma fraca ou nula neutralização, após os tempos de exposição. Por esta razão, foram realizados ensaios controle para avaliar a eficácia da ação neutralizante do meio caldo neutralizante D/E (Acumedia<sup>□</sup>) sobre a NC, sobre o carvacrol livre e sobre o hipoclorito de sódio.

Ao final do capítulo são, então, apresentados os resultados da avaliação do potencial desinfetante da NC, empregando-se o método proposto pelo Comitê Europeu de Normalização (CEN). Os resultados apresentados e discutidos neste capítulo servirão de subsídio para redação de patente e registro de proteção de propriedade intelectual e serão submetidos para publicação em periódico internacional.

## 1 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.1 Material

O carvacrol (grau de pureza = 99,8%), obtido por síntese química, foi gentilmente fornecido pela empresa Quimsar Química Fina Ltda. (Palhoça/SC). O ativo foi alíquotado e envasado em frascos de vidro âmbar, sob atmosfera modificada (N<sub>2</sub>), e as alíquotas armazenadas em freezer à -20°C até sua utilização. Para o desenvolvimento das nanoemulsões foram empregados Poloxamer 188 (Kolliphor P188 micro, BASF, EUA) e lecitina de soja (Lipoid S75-3N, Lipoid GmbH, EUA) que foram gentilmente doados pela *LIPID Ingredients & Technologies*, Brasil.

Para o estudo de citotoxicidade *in vitro* foram utilizados: fibroblastos embrionários murino Balb/c 3T3 clone a31 (Banco de Células do Rio de Janeiro/BCRJ, Brasil); meio de cultura DMEM - *Dulbecco's modified eagle medium* (GibcoTM, EUA); soro fetal bovino (GibcoTM, EUA); dimetilsulfóxido - DMSO (Merck, EUA) e MTT (brometo de 3-[4, 5-dimetil-tiazol-2-il]-2, 5-difeniltetrazólio, Merk<sup>®</sup>, EUA).

Para os ensaios para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram empregadas cepas padrão de *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 6538 e de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 (Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS - Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ/RJ), conforme recomendação da Norma Europeia 1040:2005, do Comitê Europeu de Normalização (CEN) e a cepa ATCC 14028 de *Salmonella typhimurium* (Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina/LACEN/SC), meio caldo BHI (*Brain Heart Infusion* – Merk<sup>®</sup>), microplaca de 96 poços (Kasvi) e resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido, Merk<sup>®</sup>, EUA).

No ensaio de atividade bactericida de produtos com potencial atividade desinfetante ou antisséptica utilizou-se: TSA (Ágar Triptona de Soja - Kasvi<sup>®</sup>), caldo neutralizante D/E (Acumedia<sup>®</sup>), alça Drigalski descartável e estéril (Olen/Kasvi) e placa de Petri estéril descartável (90 x 15mm) (Olen/Kasvi<sup>®</sup>).

## 1.2 Métodos

### 1.2.1 Preparação das nanoemulsões de carvacrol

As nanoemulsões contendo carvacrol foram preparadas utilizando-se a técnica de emulsificação espontânea em duas abordagens: a) método de deslocamento do solvente, utilizando etanol como solvente orgânico, e b) método de emulsificação espontânea livre de solvente. A fim de otimizar as condições de preparação, três principais parâmetros foram avaliados: concentração de carvacrol, tipo e concentração de tensoativo.

#### 1.2.1.1 Técnica de emulsificação espontânea - difusão do solvente

Na preparação das nanoemulsões pela técnica de emulsificação espontânea - difusão do solvente (BOUCHEMAL et al., 2004), a fase aquosa foi composta de 26 mL de solução aquosa contendo o emulsionante poloxamer 188 (Kolliphor P188 micro, BASF) nas concentrações de 0,15%, 0,2%, 0,25% ou 0,3% (m/v) e a fase oleosa

composta por 10 mL de solução etanólica contendo 0,25% (m/v) de lecitina de soja (Lipoid S75-3N, Lipoid GmbH) e carvacrol nas concentrações de 200 mg, 300 mg, 400 mg, ou 500 mg. A fase orgânica foi adicionada lentamente sobre a fase aquosa, com auxílio de pipeta Pasteur, sob agitação magnética, mantendo-se esta condição por, aproximadamente, 30 min. Em seguida, o solvente orgânico foi eliminado e a suspensão concentrada ao volume final de 10 mL em rotaevaporador. Por fim, as nanoemulsões foram filtradas em suporte de celulose (diâmetro de poro ~ 14 µm). A composição das diferentes formulações preparadas está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição das nanoemulsões preparadas pela técnica de emulsificação espontânea - difusão do solvente.

Formulação	Carvacrol (mg)	Poloxamer 188 (% m/v)	Lecitina de soja (% m/v)	Água (q.s.p.)
F1		0,15		10 mL
F2	200	0,20	0,25	10 mL
F3		0,25		10 mL
F4		0,30		10 mL
F5		0,15		10 mL
F6	300	0,20	0,25	10 mL
F7		0,25		10 mL
F8		0,30		10 mL
F9		0,15		10 mL
F10	400	0,20	0,25	10 mL
F11		0,25		10 mL
F12		0,30		10 mL
F13		0,15		10 mL
F14	500	0,20	0,25	10 mL
F15		0,25		10 mL
F16		0,30		10 mL

### 1.2.1.2 Técnica de emulsificação espontânea livre de solvente (auto-nanoemulsificação)

Na preparação das nanoemulsões de carvacrol pela técnica de emulsificação espontânea sem o uso de solvente orgânico (PATEL et al., 2013), uma solução contendo 0,25% (m/v) do tensoativo lipofílico lecitina (Lipoid S75-3N, Lipoid GmbH), dispersa sob aquecimento à 60°, foi previamente preparada em água. Na sequência, 0,5% (m/v) dos tensoativos não-iônicos poloxamer 188 (Kolliphor P188 micro, BASF) ou Tween® 80 (Synth®) foram adicionados à fase aquosa, sob agitação magnética. Em seguida, 98 mL da fase aquosa foram adicionados sobre

a fase oleosa constituída de 1% (m/v) de carvacrol. O sistema foi mantido sob agitação magnética por 30 min e o volume ajustado para 100 mL. A composição das formulações preparadas é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição das nanoemulsões preparadas pela técnica de emulsificação espontânea - livre de solvente.

Formulação	Carvacrol (%, m/v)	Poloxamer 188 (%, m/v)	Tween® 80® (%, m/v)	Lecitina de soja (%, m/v)	Água (q.s.p.)
FA	1	0,5	-	0,25	100 mL
FB	1	-	0,5	0,25	100 mL

## 1.2.2 Caracterização das nanoemulsões de carvacrol

### 1.2.2.1 Determinação do tamanho de partícula e índice de polidispersão

O tamanho médio e a distribuição das partículas foram determinados por espalhamento de luz dinâmico utilizando um Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments, UK), equipado com ângulo de espalhamento de 90°. As medidas foram realizadas à 25°C, após diluição (1:50) das amostras em água destilada. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 1.2.2.2 Determinação do potencial zeta

A determinação do potencial zeta das nanoemulsões foi realizada por anemometria laser Doppler utilizando um Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments, UK), após a diluição das mesmas em água destilada (1:50). As amostras foram transferidas às células eletroforéticas, onde um potencial de  $\pm 150$  mV foi aplicado. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 1.2.2.3 Determinação do pH

O pH das nanoemulsões foi determinado diretamente, sem diluição da amostra, com o uso de um potenciômetro Kasvi (modelo K39-2014B), equipado com eletrodo de vidro universal. O equipamento foi previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### *1.2.2.4 Avaliação morfológica da nanoemulsão de carvacrol preparada pela técnica de emulsificação espontânea livre de solvente (auto-nanoemulsificação)*

A morfologia das nanoemulsões foi observada em microscópio eletrônico de transmissão (JEM-1011 MET, Peabody, Estados Unidos), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Para isso, as formulações foram diluídas em água MILLI-Q<sup>®</sup> (10x) e depositadas sobre *grids* de cobre revestido com carbono (CF300-Cu, TED PELLA INC., EUA, 300 *mesh*). Após 15 min, as amostras foram coradas com acetato de uranila 2% (m/v), permanecendo em contato com o corante por pelo menos 24h. Todas as medições foram efetuadas à temperatura ambiente.

#### *1.2.2.5 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação do ativo*

A determinação da concentração total de carvacrol associado às nanoemulsões (eficiência de encapsulação/EE) foi realizada usando espectrofotômetro (BEL Photonics<sup>®</sup>), a 275 nm. A metodologia de espectrofotometria de UV-Vis foi previamente validada conforme descrito no [Apêndice A](#).

Para a determinação da concentração total de carvacrol ( $\text{Conc}_{\text{Total}}$ ) na suspensão de nanopartículas, 50  $\mu\text{L}$  da formulação foram adicionados a 12,5 mL (q.s.p) de acetronitrila, até a completa dissolução. O teor de carvacrol presente nas suspensões coloidais foi determinado por espectrofotometria UV-Vis e expresso em  $\mu\text{g/mL}$ . Os experimentos foram realizados em triplicata.

A determinação da concentração de ativo associado às nanopartículas (eficiência de encapsulação - EE) foi realizada pelo método de ultrafiltração/centrifugação, onde, 0,5 mL da nanoemulsão foi transferido para unidades de centrifugação Amicon Ultra-0,5 (Ultracel<sup>®</sup>-100 K 100.000 MW; Millipore, Corp., EUA), seguido de centrifugação (6.000 rpm, 40 min) para separar o ativo livre do carvacrol nanoencapsulado. A EE do carvacrol foi calculada a partir da diferença entre a concentração total de carvacrol ( $\text{Conc}_{\text{Total}}$ ) encontrada nas suspensões de nanopartículas, após sua completa dissolução em acetoneitrila, e a concentração de ativo livre presente no ultrafiltrado ( $\text{Conc}_{\text{Ultrafiltrado}}$ ), determinadas em espectrofotômetro (BEL Photonics<sup>®</sup>) a 275 nm. A EE foi calculada conforme Tagliari et al., (2012) (Equação 1):

$$EE (\%) \left( \frac{\text{Conc}_{\text{Total}} - \text{Conc}_{\text{Ultrafiltrado}}}{\text{Conc}_{\text{Total}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

$\text{Conc}_{\text{Total}}$  = concentração total de ativo encontrada na nanoemulsão após dissolução das nanopartículas;

$\text{Conc}_{\text{Ultrafiltrado}}$  = concentração de ativo livre encontrada no ultrafiltrado.

### 1.2.3 Avaliação da estabilidade das nanoemulsões de carvacrol

Para a realização do estudo de estabilidade físico-química das nanoemulsões de carvacrol, as formulações foram armazenadas em frascos de vidro âmbar, sob refrigeração (8°C), ou temperatura ambiente (25°C), por 120 dias. O efeito das condições de armazenamento sobre as propriedades físico-química das nanoemulsões de carvacrol foi determinado monitorando-se o tamanho médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH, conforme anteriormente descrito, em tempos pré-determinados. O teor e a eficiência de encapsulação foram avaliados após 60 dias de armazenamento à temperatura ambiente, conforme a metodologia de espectrofotometria de UV-Vis, previamente validada e descrita (Apêndice A). O aspecto físico das formulações ao longo do período de armazenamento foi avaliado visualmente quanto às possíveis alterações de coloração e homogeneidade. O comportamento das propriedades físico-químicas das formulações durante o armazenamento foi avaliado estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Bonferroni, *t-Student*, ou Tukey, utilizando o software *Graph-Pad Prism* (San Diego, CA, EUA). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### 1.2.4 Estudo da toxicidade *in vitro*

#### 1.2.4.1 Linhagem de fibroblastos murino

Os estudos de citotoxicidade *in vitro* foram realizados utilizando células de fibroblastos embrionários murino Balb/c 3T3, clone a31, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) (Rio de Janeiro, Brasil). As células 3T3 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), em pH 7,4,

suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal, 4 mM de L-glutamina, 3,7 g/L de carbonato ácido de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), 100 UI/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, à 37°C e em atmosfera com 5 % de CO<sub>2</sub>. Ao atingir aproximadamente 90% de confluência, as células foram tripsinizadas, neutralizadas com meio de cultura DMEM, centrifugadas (2.000 rpm/10 min), contadas em câmara de Neubauer e inoculadas em placas de cultivo para posterior tratamento.

#### *1.2.4.2 Determinação da viabilidade celular pelo método colorimétrico do MTT*

O efeito citotóxico de carvacrol e da nanoemulsão de carvacrol foi avaliado pelo método colorimétrico com base no metabolismo do brometo de 3-[4, 5-dimetil-tiazol-2-il]-2, 5-difeniltetrazólio (MTT), conforme descrito por Mosmann (1983). Previamente, com o objetivo de solubilizar o ativo foi preparada uma solução mãe a 30 mg/mL de carvacrol. As células foram inoculadas (10<sup>4</sup> células/poço) em placas de 96 poços (100 µL/poço) e mantidos em estufa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), durante 24 h. Na sequência, as células foram tratadas com concentrações crescentes de carvacrol ou nanoemulsão de carvacrol (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 e 100 µg/mL), por períodos de 24 h e 48 h. As microplacas foram cobertas por *Parafilm*<sup>®</sup>, uma vez que o ativo demonstrou alta volatilidade e fácil contaminação dos diferentes tratamentos. Posteriormente, foi realizada a remoção tratamento e as células foram incubadas com 10 µL de MTT (5 mg/mL em tampão fosfato salino - PBS) em 100 µL de meio fresco, durante 3 h, à 37°C. Os cristais de formazan derivados da redução no MTT na mitocôndria foram solubilizados com 50 µL de DMSO/poço e, após 10 min de incubação, a absorbância foi lida a 540 nm, em leitor de microplacas (*SpectraMax*<sup>®</sup> *Paradigm*<sup>®</sup> *Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices*). A viabilidade das células tratadas foi calculada relativamente à viabilidade celular dos controles livre de tratamento. O cálculo da concentração inibitória capaz de reduzir 50% (IC<sub>50</sub>) da viabilidade celular foi realizado através da análise de regressão linear dos dados, com auxílio do programa *Prism 5 (Graph Pad, San Diego, CA)*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

## 1.2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

### 1.2.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima

A CIM (Concentração Inibitória Mínima) do carvacrol livre e da nanoemulsão de carvacrol foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com a norma M7-A7 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006), com modificações.

#### 1.2.5.1.1 Os Isolados

Os ensaios para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos tratamentos foram realizados contra as cepas padrão de *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 6538 e de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, ambas fornecidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/RJ. A cepa ATCC 14028 de *Salmonella typhimurium* foi fornecida pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina (LACEN/SC). As cepas bacterianas foram mantidas em meio caldo BHI (*Brain Heart Infusion* - Merk), acrescido de 20% de glicerol e mantidas à -20°C. Para uso, as cepas foram repicadas em ágar BHI e após incubação, por 24 h, à 35°C ± 2°C, foram armazenadas à 8°C. Uma segunda passagem, após nova incubação foi realizada para posterior preparo do inóculo.

#### 1.2.5.1.2 Método de microdiluição em caldo

Os inóculos bacterianos foram preparados em salina estéril (0,9% NaCl, m/v). A concentração do inóculo (1,0 a 2,0 x 10<sup>8</sup> UFC/mL) foi determinada em espectrofotômetro ( $\lambda = 625$  nm) e o resultado da absorbância ajustado para o intervalo de 0,08 a 0,10, equivalente a 0,5 unidades da escala de MacFarland (CLSI, 2006).

Devido a baixa solubilidade do ativo puro no meio de cultivo bacteriano BHI (*Brain Heart Infusion* - Merk®), o carvacrol foi previamente adicionado a Tween® 80, na proporção de 1:1. Na determinação da CIM, a concentração inicial de ativo testada contra *S. aureus* foi de 1000 µg/mL, procedendo-se a diluição seriada até a concentração de 3,90 µg/mL. Contra as cepas de *S. typhimurium* e de *P. aeruginosa* a concentração variou de 4000 a 15,62 µg/mL.

Sucintamente, os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, contendo 100 µL de caldo BHI e 100 µL das diluições seriadas

dos tratamentos. Na sequência, 10 µL dos inóculos bacterianos foram adicionados. Após 20 - 24 h de incubação à 37°C ± 1°C para *S. aureus* e *S. typhimurium* e de 38°C ± 1°C para *P. aeruginosa*, procedeu-se à leitura das microplacas em espectrofotômetro ( $\lambda = 625$  nm, *SpectraMax® Paradigm® Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices*). A determinação do percentual de inibição do crescimento microbiano (%ICM) para cada concentração testada foi realizada conforme Gudiña et al. (2010), com adaptações (Equação 2).

$$\%ICM = \left[ 1 - \left( \frac{Ab_c}{Ab_0} \right) \right] \times 100 \quad (2)$$

Onde:

% ICM = percentagem de inibição do crescimento microbiano;

$Ab_c$  = média das absorvâncias, por concentração testada, subtraída da média das absorvâncias dos poços sem inóculo;

$Ab_0$  = média das absorvâncias dos poços controle, i.e., 100% de crescimento microbiano.

O controle da densidade populacional do inóculo bacteriano foi realizado conforme orientações do CLSI (2006). O meio caldo BHI contendo as diferentes diluições dos tratamentos, sem inóculo, foi utilizado como controle negativo. O caldo desprovido de bactérias foi utilizado como controle de esterilidade do meio de cultivo e do ensaio. O controle de 100% de crescimento microbiano consistiu de meio caldo BHI contendo os veículos (nanoemulsão branca, ou Tween® 80), nas mesmas concentrações dos tratamentos testados, acrescido de inóculo bacteriano. Como controle de inibição do crescimento microbiano os antibióticos comerciais tobramicina 0,3% (Neo Química®) e sulfato de gentamicina 0,5% (Allergan®) - m/v - foram utilizados contra três cepas bacterianas (*S. aureus*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*). Assim, a CIM dos antibióticos também foi determinada pelo ensaio de microdiluição em caldo BHI, conforme norma M7-A7 do CLSI (CLSI, 2006), com modificações. Os antibióticos foram classificados conforme sua resistência ou sensibilidade de acordo com a norma M100-S16 do CLSI (CLSI, 2006).

A sensibilidade das cepas ATCC de *S. aureus*, de *S. typhimurium* e de *P. aeruginosa* foi avaliada segundo o método de difusão em ágar da Norma M2-A9 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*

(CLSI, 2006). Os antibióticos clindamicina 2 µg, eritromicina 15 µg e gentamicina 10 µg foram testados em *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Discos de ciprofloxacina 5 µg e ampicilina 10 µg foram testados contra *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e discos de gentamicina 10 µg e ciprofloxacina 5 µg contra *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). Segundo o diâmetro dos halos de inibição formados pelos antibióticos, as cepas bacterianas foram classificadas conforme sua resistência ou sensibilidade, de acordo com os critérios definidos pela norma M100-S16 do CLSI (CLSI, 2006).

A CIM também foi confirmada por método colorimétrico, através da adição de 50 µL de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona10-óxido), preparada na concentração de 100 µg/mL em água destilada. Após 30 min de incubação adicional à 35°C, a CIM foi considerada a concentração imediatamente acima da primeira concentração com presença de crescimento bacteriano (coloração rosa), conforme descrito por Mann e Markham (1998).

No presente estudo, estabeleceu-se que a concentração inibitória mínima (CIM) é o valor determinante de percentual de inibição de crescimento microbiano igual ou superior a 90%. Os resultados foram avaliados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, utilizando o software *Graph-Pad Prism* (San Diego, CA, EUA). Todos os experimentos foram realizados de forma independente, em triplicata.

### 1.2.6 Teste da avaliação da atividade desinfetante

A avaliação da atividade desinfetante da nanoemulsão de carvacrol (NC) utilizou o método de diluição/neutralização, conforme a Norma Europeia 1040:2005 - Teste de suspensão quantitativo, para avaliação da atividade bactericida de desinfetantes químicos e antissépticos (fase 1), do Comitê Europeu de Normalização (CEN), com adaptações (EUROPEAN STANDARD 1040:2005). Para fins de comparação, a atividade desinfetante do ativo livre e do hipoclorito de sódio também foram avaliadas.

#### 1.2.6.1 Os isolados

O ensaio de atividade desinfetante ou antisséptica do carvacrol, da nanoemulsão de carvacrol e do hipoclorito de sódio foi realizado contra as cepas padrão de *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 6538 e de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, em atendimento a

EN 1040:2005 (EUROPEAN STANDARD 1040:2005). As cepas bacterianas foram fornecidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/RJ.

A padronização da suspensão bacteriana inicial (N) a  $1,0 \times 10^8$  -  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL (0,5 da escala MacFarland) seguiu a norma M7-A7 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006). A suspensão de validação (Nv), utilizada para os controles de validação do teste, foi preparada diluindo-se a suspensão bacteriana inicial (N), em solução diluente, até a obtenção de uma suspensão bacteriana a  $3,0 \times 10^3$  a  $1,6 \times 10^4$  UFC/mL.

#### *1.2.6.2 Controles de validação do método de diluição/neutralização*

A EN 1040:2005 preconiza a realização de três controles para a validação do ensaio, a saber: a) controle da condição experimental selecionada e/ou verificação da ausência de qualquer efeito letal das condições do ensaio; b) controle de ausência de toxicidade do neutralizante sobre as cepas, e c) controle da neutralização do produto testado.

#### *1.2.6.3 Método de diluição/neutralização*

No ensaio da atividade bactericida de desinfetantes químicos e antissépticos (fase 1) pelo método de método de diluição/neutralização, todo o procedimento foi realizado em banho de água à  $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . A um tubo contendo 1,0 mL de água deionizada estéril foi transferido 1,0 mL da suspensão bacteriana inicial (N). Após 2 min, foram adicionados ao tubo 8,0 mL dos produtos em teste (carvacrol, nanoemulsão de carvacrol ou hipoclorito de sódio comercial). Decorridos os tempos de contato pré-estabelecidos (5 min, 30 min, 24 h, 48 h e 72 h) para a ação dos produtos, 1,0 mL da mistura teste (Na) foi transferido para um tubo contendo 1,0 mL de água e 8,0 mL de solução neutralizante (caldo neutralizante D/E - Accumedia<sup>®</sup>). Transcorridos 5 min para neutralização dos produtos, 100  $\mu\text{L}$  da mistura teste (Na) foram plaqueados, com auxílio de alça de Drigalski, usando a técnica de espalhamento *pos plate*, em duplicata, em meio TSA (ágar tripton de soja). As placas foram incubadas por 24 h, à  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . Após o tempo de incubação, foi realizada a contagem das UFC observadas nas placas de meio TSA.

Os experimentos realizados de forma independente, em triplicata, para as três concentrações dos produtos testados (Tabela 5) e, conforme recomendação da EN 1040:2005, uma concentração deve ser ineficaz

em eliminar os microrganismos utilizados no ensaio. O carvacrol foi previamente misturado a Tween<sup>®</sup> 80, na proporção 1:1, para permitir a dispersão do mesmo no meio diluente.

Tabela 5 - Concentrações de carvacrol, nanoemulsão de carvacrol e de hipoclorito de sódio comercial submetidas ao teste de suspensão quantitativo, para avaliação da atividade bactericida de desinfetantes químicos e antissépticos (fase 1) da EN 1040:2005 do CEN.

<b>Produtos Testados</b>	<b>Concentração (%, m/v)</b>
Carvacrol livre	0,8
	0,4
	0,02
Nanoemulsão de Carvacrol	0,8
	0,4
	0,002
Hipoclorito de Sódio Comercial	1,6
	0,8
	0,0002

Para comprovar a ação bactericida de um produto e sua consequente aptidão para seguir às próximas etapas e fases propostas pela norma europeia EN 14885:2015, este deverá reduzir a população bacteriana inicial em pelo menos 5 *log*. Para tal, o cálculo do logaritmo da redução (*logR*) foi realizado (Equação 3) (EN 1040:2005).

$$\log R = \log N_0 - \log N_a \quad (3)$$

Onde:

$N_0$  = é o valor referente ao número de UFC/mL, na mistura teste, antes do início dos tempos de contato ( $t = 0$ ) com o produto, dividido por 10;

$N_a$  = é o valor referente ao número de UFC/mL na mistura teste ( $N_a$ ), ao final dos tempos de contato (5 min, 30 min, 24 h, 48 h e 72 h).

As médias do logaritmo da redução (*logR*) foram comparadas estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, utilizando o software *Graph-Pad Prism* (San Diego, CA, EUA).

## 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1 Estudo de formulação

#### 2.1.1 Nanoemulsões de carvacrol preparadas pela técnica de emulsificação espontânea - difusão do solvente

A fim de avaliar a influência dos componentes sobre as características físico-químicas das nanoemulsões e otimizar as condições de preparação, formulações com diferentes concentrações do surfactante poloxamer 188 e do ativo carvacrol foram preparadas pela técnica de emulsificação espontânea - difusão do solvente (BOUCHEMAL et al., 2004). Todas as formulações desenvolvidas apresentaram coloração branca leitosa e odor característico do carvacrol. Com exceção das formulações preparadas com 500 mg de carvacrol (F13, F14, F15 e F16) que apresentaram gotículas de ativo livre na superfície, as demais apresentaram aspecto homogêneo sob análise visual. As propriedades físico-químicas das nanoemulsões de carvacrol desenvolvidas são apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2 - Caracterização físico-química das nanoemulsões de carvacrol quanto ao tamanho de partícula, PDI e potencial zeta. Variáveis da formulação: concentração de ativo (carvacrol) e tensoativo (poloxamer 188). Resultados apresentados como média  $\pm$  padrão (n = 3). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre as concentrações de surfactante para a mesma concentração de ativo. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre as concentrações de ativo para a mesma concentração de surfactante ( $p < 0,05$ ; ANOVA via única seguida do pós teste Bonferroni).

Formulação	Carvacrol (mg)	Poloxamer 188 (%)	Tamanho de partícula (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
F1		0,15	28,84 ± 4,22 / 179,37 ± 0,80 <sup>aA</sup>	0,277 <sup>abA</sup> ± 0,01	-41,77 <sup>aA</sup> ± 3,71
F2 <sup>a</sup>	200	0,20	81,26 ± 1,41 <sup>bA</sup> / 4732,00 ± 144,52	0,238 <sup>aA</sup> ± 0,03	-34,80 <sup>aA</sup> ± 2,08
F3		0,25	31,38 ± 14,26 / 157,90 ± 34,83 <sup>aA</sup>	0,278 <sup>abA</sup> ± 0,02	-43,30 <sup>aA</sup> ± 1,97
F4 <sup>a</sup>		0,30	103,33 ± 4,89 <sup>bA</sup> / 4885,00 ± 265,79	0,341 <sup>bA</sup> ± 0,04	-37,70 <sup>aA</sup> ± 5,28
F5		0,15	163,47 ± 16,06 <sup>aA</sup>	0,217 <sup>aA</sup> ± 0,01	-50,07 <sup>aA</sup> ± 3,22
F6		0,20	157,17 ± 12,10 <sup>abB</sup>	0,226 <sup>abA</sup> ± 0,02	-39,80 <sup>bAB</sup> ± 1,19
F7 <sup>a</sup>	300	0,25	139,56 ± 9,05 <sup>aA</sup> / 5106,66 ± 166,38	0,246 <sup>abA</sup> ± 0,01	-44,60 <sup>abA</sup> ± 1,10
F8 <sup>a</sup>		0,30	126,13 ± 16,38 <sup>aA</sup> / 4371,50 ± 111,02	0,267 <sup>ba</sup> ± 0,02	-45,80 <sup>abB</sup> ± 1,13
F9		0,15	160,73 ± 16,60 <sup>aA</sup>	0,171 <sup>aA</sup> ± 0,01	-43,67 <sup>aA</sup> ± 5,71
F10 <sup>a</sup>		0,20	165,87 ± 15,86 <sup>abB</sup> / 5122,33 ± 148,26	0,220 <sup>aA</sup> ± 0,02	-39,50 <sup>abB</sup> ± 3,31
F11 <sup>a</sup>	400	0,25	198,93 ± 42,30 <sup>abB</sup> / 4825,50 ± 784,18	0,224 <sup>abB</sup> ± 0,05	-44,67 <sup>aA</sup> ± 1,53
F12 <sup>a</sup>		0,30	171,63 ± 42,84 <sup>abB</sup> / 5113,50 ± 142,13	0,149 <sup>ab</sup> ± 0,03	-43,75 <sup>abB</sup> ± 2,62
F13 <sup>a</sup>		0,15	205,76 ± 48,88 <sup>aA</sup>	0,224 <sup>aA</sup> ± 0,11	-48,57 <sup>aA</sup> ± 5,02
F14 <sup>a</sup>		0,20	215,73 ± 59,69 <sup>abB</sup>	0,262 <sup>aA</sup> ± 0,11	-44,73 <sup>ab</sup> ± 2,71
F15 <sup>a</sup>	500	0,25	255,90 ± 37,94 <sup>abB</sup>	0,150 <sup>ab</sup> ± 0,02	-46,33 <sup>aA</sup> ± 2,00
F16 <sup>a</sup>		0,30	229,97 ± 16,74 <sup>abB</sup>	0,140 <sup>ab</sup> ± 0,04	-46,70 <sup>ab</sup> ± 0,10

<sup>a</sup>Formulação com presença de gotículas de óleo na superfície.

<sup>ab</sup>Formulação com presença de uma população de partículas de tamanho superior ao nanométrico.

A análise por espalhamento de luz dinâmico mostrou que o tamanho de partícula das nanoemulsões desenvolvidas variou de 81,26 a 255,90 nm.

Sabe-se que a concentração de surfactante influencia diretamente o tamanho de partícula de sistemas coloidais, porém neste estudo não foi detectada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no tamanho médio das gotículas entre as formulações em investigação. Essa informação sugere que independente da concentração de tensoativo utilizada, o sistema encontrou um equilíbrio, onde o tamanho da gotícula formada não foi influenciado. Apenas nas formulações preparadas com 200 mg de carvacrol, o aumento da concentração de surfactante de 0,15% para 0,30% (F1 e F4) resultou na redução significativa ( $p < 0,05$ ) de até 76 nm no diâmetro da gotícula.

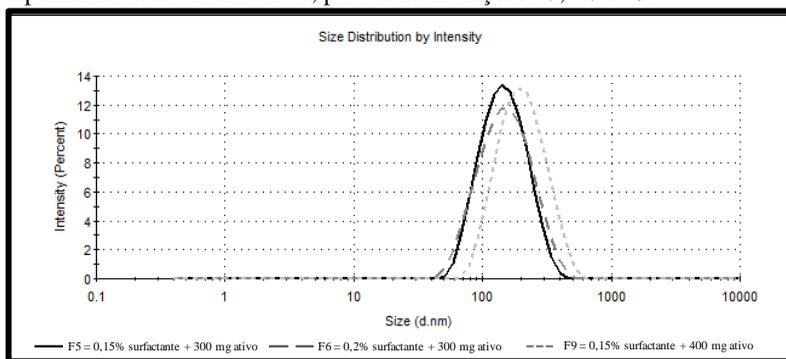
O tamanho das partículas mostrou-se dependente da concentração de carvacrol adicionada ao sistema, detectando-se incremento significativo ( $p < 0,05$ ) no tamanho das gotículas das nanoemulsões contendo igual quantidade de tensoativo. As formulações com os maiores tamanhos de partícula foram desenvolvidas com as maiores concentrações de carvacrol (500 mg). Esses dados confirmam a proposição de que a concentração de óleo e/ou ativo de consistência oleosa utilizada na formulação é fator determinante no diâmetro de partícula (SCHAFFAZICK et al., 2003). Apenas nas formulações preparadas com 0,15% de poloxamer (F1, F5, F9 e F13), o aumento da concentração de 200 para 500 mg de carvacrol não resultou em elevação ( $p < 0,05$ ) no diâmetro da gotícula.

No estudo conduzido por Sakeena e colaboradores (2011), avaliando a influência da concentração de ésteres de óleo de palma e de cetoprofeno sobre o tamanho das gotículas de nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea, observou-se que o diâmetro médio das gotículas mostrou relação direta com a concentração de óleo incorporada ao sistema. Hosseini e colaboradores (2013), também observaram que o tamanho médio das nanopartículas de quitosana e trifosfato de sódio contendo carvacrol aumentou proporcionalmente à quantidade de ativo adicionada ao sistema. Segundo Bruxel e colaboradores (2012), um aumento de 10% na concentração de óleo pode aumentar significativamente o diâmetro da partícula.

Nas formulações nomeadas F2, F4, F7, F8, F10, F11 e F12 foi detectada uma pequena porcentagem, não representativa, de partículas na faixa de 4 a 5 micrômetros, ocasionando a aparecimento de um segundo pico. Este segundo pico pode ser atribuído ao movimento e à agregação momentânea das partículas no momento da análise. Já, as formulações F1 e F3 apresentaram populações de partículas com

tamanho muito reduzido, o que sugere a presença de micelas que, por sua vez, podem resultar da quantidade excessiva de tensoativo na formulação (LOVELYN; ATTAMA, 2011). Nas formulações F13, F14, F15 e F16, preparadas com 500 mg de carvacrol, constatou-se em análise visual a presença de gotículas de carvacrol na superfície da formulação (Quadro 2). Assim, somente as formulações F5, F6 e F9, após análise da distribuição do tamanho das partículas pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, apresentaram uma população de tamanho de partícula (Figura 5).

Figura 5 - Distribuição do tamanho de nanopartículas, determinada por espalhamento de luz dinâmico, para as formulações F5, F6 e F9.



O índice de polidispersão (PDI) é um indicador da distribuição do diâmetro das partículas no sistema coloidal (SYED; SARKAR, 2018; GALINDO-PÉREZ et al., 2018; KHATIBI et al., 2015) e pode ser correlacionado à estabilidade do sistema (BARANAUSKAITE et al., 2018). Khatibi e colaboradores (2015), afirmam que um valor inferior a 0,1 indica uma população de partículas homogênea, enquanto valores acima de 0,3 revelam um alto grau de heterogeneidade. Já, Galindo-Pérez e demais pesquisadores (2018), sugerem que valores entre 0,1 e 0,3 indicam uma estreita distribuição no tamanho das partículas. Baranauskaite e colegas (2018), propõem que o valor ideal de PDI seja menor ou igual a 0,30, significando que, pelo menos 66,7% de todas as nanovesículas apresentam um mesmo tamanho. Pesquisadores mais rigorosos atribuem a valores de PDI inferiores a 0,25 a ocorrência de partículas com tamanho semelhante, conferindo homogeneidade adequada ao sistema (KABRI et al., 2011; ALMEIDA et al., 2009; ALVES et al., 2007). Entretanto, é senso comum entre os pesquisadores referenciados que valores de PDI superiores a 0,3 indicam a presença de

partículas com ampla distribuição de tamanho. Os resultados deste estudo mostram que apenas a F4 apresentou alto grau de heterogeneidade na distribuição do tamanho de partícula, com valor de PDI superior a 0,3. Nas formulações F1, F3, F8 e F14 o valor de PDI foi superior a 0,25, enquanto nas demais formulações foram observados valores inferiores a 0,25 (Quadro 2).

A medição do potencial zeta (PZ) é, atualmente, a forma mais simples e direta de caracterizar a superfície dos colóides. Segundo Honary e Zahir (2013), o PZ pode ser definido como o valor eletrocinético que associa uma magnitude realista à carga superficial da partícula. Para Syed e Sarkar (2018), o PZ também indica o grau de repulsão eletrostática superficial entre partículas com carga similar.

As formulações desenvolvidas apresentaram valores de potencial zeta entre -34,8 a -50,07 mV (Quadro 2). O elevado PZ das formulações desenvolvidas, em módulo, é indicativo de boa estabilidade física dos sistemas coloidais a longo prazo, pois grandes forças repulsivas entre as partículas tendem a evitar a agregação destas, após colisões ocasionais de nanogotículas adjacentes (SYED; SARKAR, 2018; GALINDO-PÉREZ et al., 2018; SCHAFFAZICK et al., 2003). Por outro lado, emulsões com valores menores tendem a flocular facilmente e podem levar ao processo de cremação, ou sedimentação (SYED; SARKAR, 2018).

Neste estudo, não foram detectadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos valores do PZ entre as formulações preparadas com diferentes concentrações de poloxamer e mesma concentração de carvacrol. Entretanto, diferenças ( $p < 0,05$ ) nos valores de PZ entre as formulações que continham a mesma concentração de poloxamer e os conteúdos de carvacrol em estudo foram observadas. Apesar disso, não se constatou uma relação direta entre o aumento da concentração de carvacrol incorporada aos sistemas e os valores de PZ (Quadro 2).

A presença da lecitina nas formulações desenvolvidas parece ser a maior responsável por determinar carga negativa à interface das gotículas, por conter fosfolipídios com grupamentos polares negativamente carregados, e.g., fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e ácido fosfatídico (BRUXEL et al., 2012). A presença de grupamentos hidroxilas das moléculas de carvacrol também pode ter contribuído, em menor parcela, à ocorrência da carga negativa das partículas que se encontram dispersas no desenvolvido.

Frente ao perfil monodisperso; a ausência de óleo na superfície da formulação; o tamanho de partícula adequado e um PZ com valor que sugere tratem-se de sistemas estáveis, as formulações F5, F6 e F9 foram selecionadas para o estudo de estabilidade dos nanoderivados do carvacrol.

### 2.1.2 Nanoemulsões de carvacrol preparadas pela técnica de emulsificação espontânea livre de solvente (auto-nanoemulsificação)

Na técnica de emulsificação espontânea, os constituintes da fase interna são solubilizados em solvente orgânico e vertidos na fase aquosa, seguido da retirada do solvente, geralmente por destilação, sob baixa pressão (BRUXEL et al., 2012). Uma das desvantagens deste método é o uso de solvente orgânico (e.g., acetona e etanol) e a permanência residual deste na formulação final (MANGALE et al., 2015; KANWALE et al., 2015; MARCATO, 2009). Além disso, algumas vezes, é necessária uma proporção elevada de solvente orgânico para a solubilização do óleo e a consequente formação de nanoemulsão com tamanho de gotícula adequado (MANGALE et al., 2015; KANWALE et al., 2015; MARTINI; CARVALHO; TEIXEIRA, 2007). Ainda, o processo de remoção do solvente pode parecer simples à escala laboratorial, mas pode representar uma barreira ao escalonamento da produção (MANGALE et al., 2015; KANWALE et al., 2015).

Diante do exposto, objetivando o desenvolvimento de formulações livres de organosolventes na dispersão final, duas nanoemulsões de carvacrol foram eficientemente produzidas pela técnica de emulsificação espontânea, conforme anteriormente descrito (Tópico 1.2.1.2 - Técnica de emulsificação espontânea livre de solvente (auto-nanoemulsificação)). Ambas as formulações apresentaram aspecto homogêneo, com coloração branca leitosa e odor característico de carvacrol. As propriedades físico-químicas das nanoemulsões de carvacrol são apresentados na Tabela 6. Todas as variáveis analisadas (tamanho de partícula, PDI e potencial zeta) diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre as formulações FA e FB.

Tabela 6 - Caracterização físico-química das nanoemulsões quanto ao tamanho médio de partícula, PDI e potencial zeta. Variável da formulação: tipo de tensoativo (% m/v). Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 2$ ). Letras minúsculas distintas, em uma mesma coluna, representam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ; ANOVA via única seguida do teste *t-student*).

Formulações	Tamanho de partícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
FA	354,20 <sup>a</sup> $\pm$ 13,29	0,104 <sup>a</sup> $\pm$ 0,01	-34,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,78
FB	229,90 <sup>b</sup> $\pm$ 25,17	0,391 <sup>b</sup> $\pm$ 0,05	-26,8 <sup>b</sup> $\pm$ 2,05

A análise por espalhamento de luz dinâmico mostrou que o tamanho de partícula das nanoemulsões variou de 229,90 a 354,20 nm. O tipo de tensoativo empregado influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) o tamanho das gotículas das nanoemulsões preparadas. A formulação contendo poloxamer apresentou maior tamanho de partícula (Tabela 6).

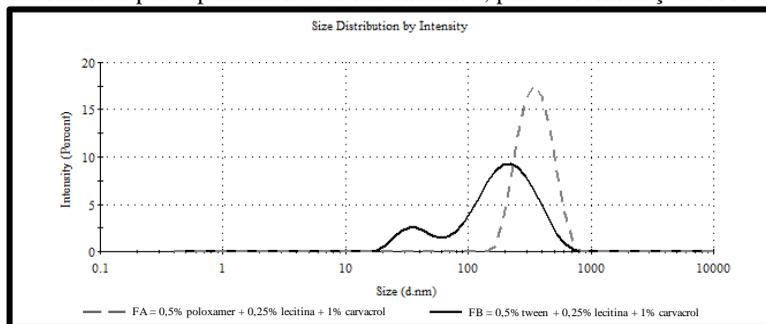
O aumento do tamanho de partícula observado nas formulações desenvolvidas com o mesmo tensoativo e com técnica de auto-nanoemulsificação livre de solvente orgânico (formulação FA) comparativamente às formulações preparadas pela emulsificação espontânea - deslocamento de solvente (formulações F5, F6 e F9) também pode resultar dos diferentes métodos de preparação. Segundo, Almeida, Teixeira e Koester (2008) e Khatibi, et al. (2015), o método de preparo possui grande influência sobre as propriedades físico-químicas dos nanoderivados, em especial o diâmetro de gotícula das emulsões. Galindo-Pérez e demais pesquisadores (2018), observaram que com dois minutos de homogeneização ultra-sônica foram preparadas nanocápsulas de óleo de limão, óleo de alecrim e curcumina, usando policaprolactona, com tamanho de partículas menores do que as preparadas por agitação mecânica, possuindo um comportamento monomodal. O tamanho das nanocápsulas preparadas com ultrassom variou de 159 a 196,4 nm, enquanto a homogeneização mecânica resultou em nanopartículas com tamanhos entre 361,5 e 442 nm. Apesar dos métodos propiciarem a formação de nanocápsulas de diâmetros distintos a EE das nanocápsulas de óleo de limão, óleo de alecrim e curcumina preparadas por homogeneização mecânica foi comparável à EE das formulações obtidos por ultrassom.

O fato das modificações na composição quali-quantitativa e no método de preparação das nanopartículas ter resultado em partículas com tamanho médio superior ao encontrado nas demais formulações estudadas não foi considerado fator impeditivo à seleção da formulação FA para continuidade aos estudos. Ao contrário, em geral, nanoemulsões contendo diâmetros entre 200 a 500 nm tendem a ser fisicamente mais estáveis (BRUXEL et al., 2012). Além disso, segundo Alencastre et al. (2006), a análise de tamanho de partícula é importante nos estudos de penetração cutânea, uma vez que, dependendo do tamanho observado, pode-se prever a probabilidade de as partículas penetrarem no estrato córneo, ou nos folículos capilares. Segundo Baillo e Lima (2012), partículas com diâmetros acima de 100 nm tendem a ficar retidas no estrato córneo e serem eliminadas no processo de renovação da pele. Fotoprotetores contendo nanopartículas na escala de 250 nm permaneceram retidos na epiderme, não sendo absorvidos pela

derme. Considerando a probabilidade de nanopartículas com dimensões inferiores a 100 nm atravessarem membranas biológicas e entrarem na corrente sanguínea (BAILLO; LIMA, 2012) e sendo objetivo deste estudo desenvolver um produto nanotecnológico com potencial antimicrobiano, o fato das partículas do sistema FA apresentarem diâmetros superiores a 300 nm depõe a favor do uso seguro desta formulação em caso de contato acidental com pelo ou mucosas.

Os resultados deste estudo mostraram que a formulação FB apresentou alto grau de heterogeneidade na distribuição do tamanho de partícula, com valor de PDI superior a 0,3. A formulação FA apresentou o valor de PDI (0,104) (Tabela 6) requerido para que os sistemas nanoestruturados sejam considerados homogêneos e monodispersos (GALINDO-PÉREZ et al., 2018; KHATIBI, et al., 2015; LOVELYN; ATTAMA, 2011; KABRI et al., 2009). A formulação FB apresentou perfil polimodal de distribuição de tamanho de partículas (Figura 6).

Figura 6 - Distribuição do tamanho de populações de nanopartículas, determinada por espalhamento de luz dinâmico, para as formulações FA e FB.



Todas as formulações desenvolvidas apresentaram carga superficial negativa, com valores de PZ que, em módulo, sugerem que os sistemas coloidais apresentam adequada estabilidade. Entretanto, foram observadas diferenças significativa nos valores de PZ ( $p < 0,05$ ) entre as formulações e uma relação direta entre os valores de PZ e o tipo de tensoativo utilizado (Tabela 6). Novamente, a presença de lecitina nas formulações é responsável por determinar carga negativa à interface das gotículas. A lecitina e o poloxamer utilizados no desenvolvimento destas formulações são os componentes que efetivamente influenciam os valores do PZ, corroborando resultados prévios (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Apesar de apresentar um tamanho de partícula maior que as demais formulações desenvolvidas, as demais variáveis investigadas determinaram a seleção da formulação FA para o estudo de estabilidade.

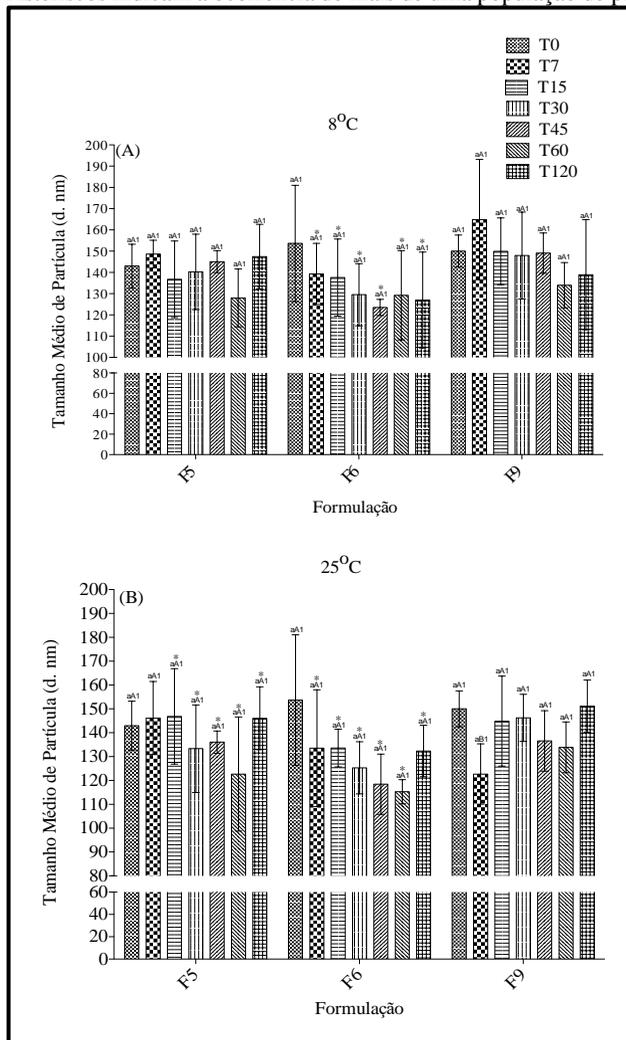
## **2.2 Avaliação da estabilidade**

### **2.2.1 Nanoemulsões de carvacrol obtidas pela técnica de emulsificação espontânea - difusão do solvente**

Neste estudo, as propriedades físico-químicas das formulações F5, F6 e F9, preparadas pela técnica de emulsificação espontânea - difusão do solvente, foram monitoradas, em tempos pré-determinados (0, 5, 15, 30, 45, 60 e 120 dias), sob duas condições térmicas, i.e., refrigeração à 8°C e temperatura ambiente (25°C). As formulações F5, F6 e F9 apresentaram aspecto homogêneo, coloração branca leitosa e odor característico de carvacrol ao longo do estudo de estabilidade. Nas condições térmicas investigadas, nenhuma das formulações apresentou alteração de cor, odor ou a ocorrência de outros fenômenos que visualmente indicaram instabilidade do sistema. Via de regra, suspensões coloidais não possuem tendência à separação de fases até alguns meses após a preparação, pois o processo de sedimentação é lento para partículas submicrométricas, sendo minimizado pelo movimento Browniano. Com o tempo, pode ocorrer a aglomeração de partículas e, conseqüentemente, a sedimentação (CODEVILLA et al., 2015; SCHAFFAZICK et al., 2003).

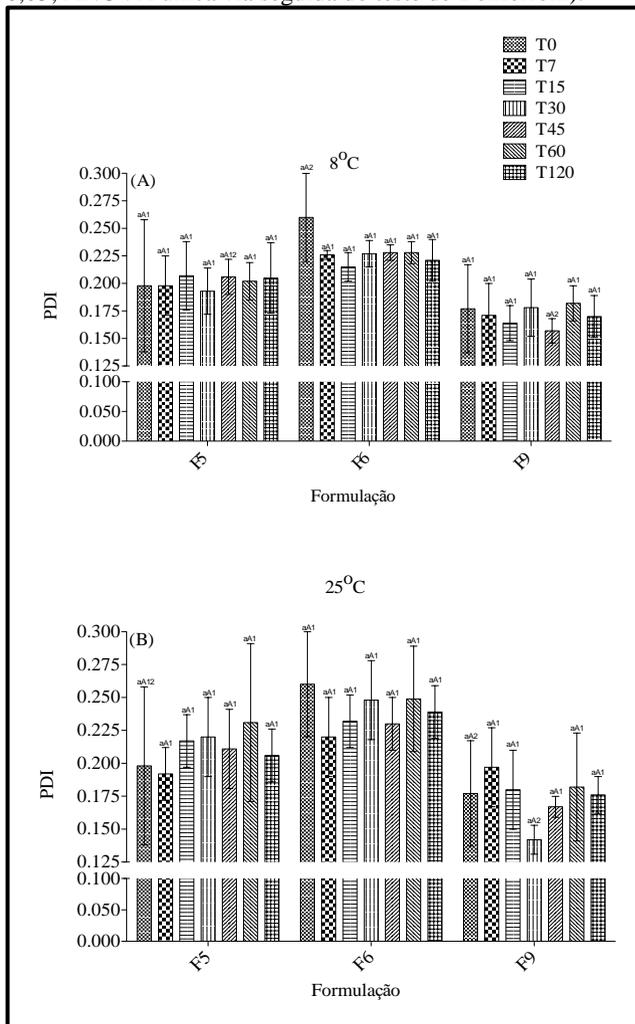
Em nenhuma das formulações (F5, F6 e F9) o tamanho médio de partícula mostrou-se alterado ( $p < 0,05$ ), tanto entre as formulações armazenadas a temperatura ambiente quanto entre aquelas armazenadas sob refrigeração, sugerindo que a forma de armazenamento não afetou o diâmetro das gotículas. Entretanto, a nanoemulsão F6, em ambas temperaturas de estocagem, apresentou a partir do sétimo dia do estudo a ocorrência de uma segunda população de partícula. Na nanoemulsão F5, armazenada à temperatura ambiente, também foi observada a ocorrência de duas populações de partículas distintas. Apenas a formulação F9, independente da temperatura de armazenamento, permaneceu monodispersa ao longo de 120 dias (Figura 7).

Figura 7 - Valores médios de tamanho de partícula das formulações F5, F6 e F9, no período de 120 dias de armazenamento: **(A)** à 8°C e **(B)** à 25°C. Dados apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento por formulação. Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as temperaturas de armazenamento para uma mesma formulação. Números distintos representam diferenças significativas entre formulações para o mesmo tempo e temperatura de armazenamento ( $p < 0,05$ ; ANOVA única via seguida do teste de Bonferroni). Asteriscos indicam a ocorrência de mais de uma população de partícula.



Ao longo do estudo de estabilidade, as nanoemulsões F6 e F9 apresentaram, respectivamente, os maiores e menores valores médios de PDI. Todavia, as formulações investigadas não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) quanto àquela variável, independente das condições de temperatura de armazenamento (Figura 8).

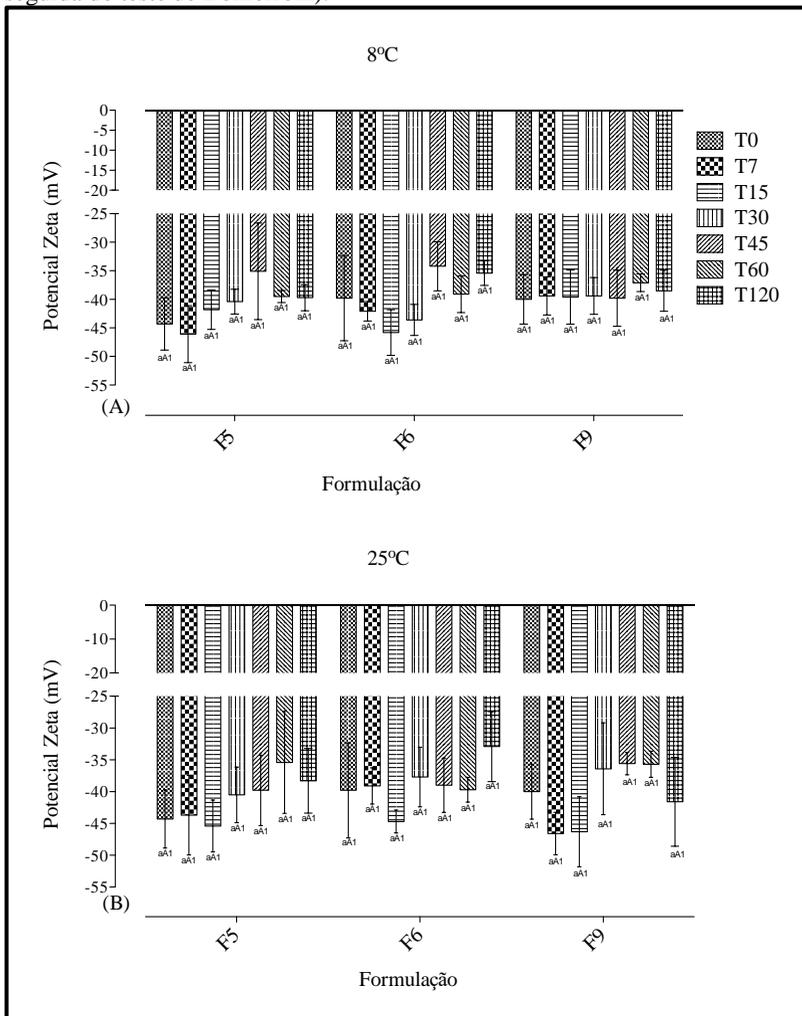
Figura 8 - Valores médios de PDI (Índice de Polidispersão) das formulações F5, F6 e F9, no período de até 120 dias de armazenamento: (A) à 8°C e (B) à 25°C. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento por formulação. Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as temperaturas de armazenamento para uma mesma formulação. Números distintos representam diferenças significativas entre formulações para o mesmo tempo e temperatura de armazenamento ( $p < 0,05$ ; ANOVA única via seguida do teste de Bonferroni).



Para Syed e Sarkar (2018), o PZ além de caracterizar a carga superficial das partículas fornece uma indicação sobre o grau de repulsão eletrostática superficial entre partículas com carga similar. Por esta razão, Baranauskaite e pesquisadores (2018) referem que o PZ é uma variável importante à previsão e avaliação da estabilidade dispersional de formulações nanoestruturadas. Kanwale e pesquisadores (2015) referem que um PZ mínimo de 20 mV (valor em módulo) é desejável para que o sistema coloidal tenha estabilidade. Segundo Bruxel e colaboradores (2012) em estudo de estabilidade de nanoemulsões, a redução do valor (em módulo) do PZ da ordem de 40 mV para 25 mV, ou menos, tende a provocar um aumento na taxa de floculação e coalescência das formulações. Conforme Baranauskaite e pesquisadores (2018), valores (em módulo) de PZ iguais ou maiores que 30mV apontam para sistemas estáveis, uma vez que, as altas cargas superficiais induziriam a repulsão das nanopartículas, impedindo sua agregação. Galindo-Pérez e colaboradores (2018) acrescentam que os valores do PZ também dependem da natureza química e da concentração do polímero e dos estabilizantes empregados no desenvolvimento do sistema, conforme consonância com o observado neste trabalho.

Em ambas as situações térmicas de armazenamento investigadas, os valores do PZ das formulações não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Nas nanoemulsões selecionadas para o estudo de estabilidade, os valores médios deste parâmetro físico-químico permaneceram acima de - 32,900 mV, durante 120 dias. Assume-se que este é o provável motivo da manutenção da estabilidade dos sistemas desenvolvidos, haja vista nenhuma formulação evidenciou fenômenos de cremação, sedimentação, coalescência ou a maturação de Ostwald (Figura 9).

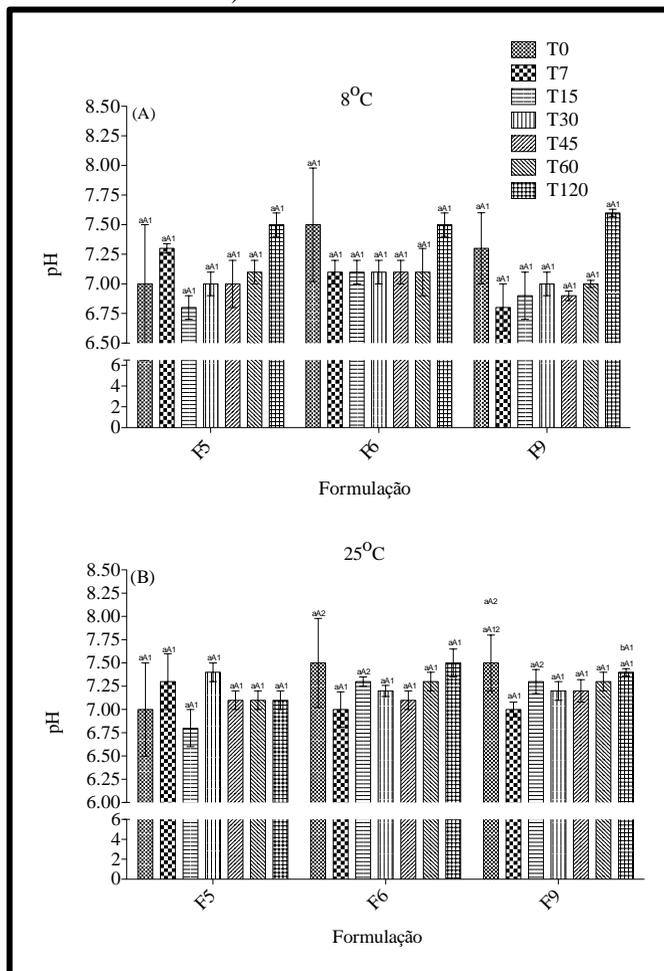
Figura 9 - Valores médios de potencial zeta das formulações F5, F6 e F9, no período de 120 dias de armazenamento: **(A)** à 8°C e **(B)** à 25°C. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento por formulação. Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as temperaturas de armazenamento para uma mesma formulação. Números distintos representam diferenças significativas entre formulações para o mesmo tempo e temperatura de armazenamento ( $p < 0,05$ ; ANOVA única via seguida do teste de Bonferroni).



Informações relevantes sobre a estabilidade de suspensões nanoparticuladas podem ser obtidas mediante o monitoramento do pH, em função do tempo (JÚNIOR et al., 2013). A alteração desta variável pode indicar a degradação de componentes da formulação (JÚNIOR et al., 2013; SCHAFFAZICK et al., 2003), presença de contaminante microbiano não sensível ao ativo encapsulado ou, simplesmente início de algum fenômeno de instabilidade do sistema como, por exemplo, o efeito de Ostwald (JÚNIOR et al., 2013; LAHOUD; CAMPOS, 2010). Nanoemulsões preparadas com OE podem exibir um decréscimo no pH devido à hidrólise dos ésteres de ácidos graxos, resultando no aumento da concentração de ácidos graxos livres, os produtos majoritários da degradação das formas esterificadas (JÚNIOR et al., 2013).

Os valores de pH das formulações F5, F6 e F9, não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) em função das condições térmicas de armazenamento, ao longo dos 120 dias do estudo, sugerindo a estabilidade química do ativo encapsulado (Figura 10).

Figura 10 - Valores médios de pH das formulações F5, F6 e F9 no período de 120 dias de armazenamento: (A) à 8°C e (B) à 25°C. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento por formulação. Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as temperaturas de armazenamento para uma mesma formulação. Números distintos representam diferenças significativas entre formulações para o mesmo tempo e temperatura de armazenamento ( $p < 0,05$ ; ANOVA única via seguida do teste de Bonferroni).



A análise dos parâmetros físico-químicos, indicadores de estabilidade, ao longo de 120 dias, permite concluir que todas as formulações apresentaram-se estáveis à temperatura ambiente e sob refrigeração. Também é possível inferir que mesmo o sistema desenvolvido com menor concentração de tensoativo (0,15% m/v) e maior quantidade de ativo (400 mg) se manteve estável, como observado para a formulação F9.

### 2.2.2 Nanoemulsões de carvacrol preparadas pela técnica de emulsificação espontânea livre de solvente (auto-nanoemulsificação)

O comportamento das propriedades físico-químicas da nanoemulsão de carvacrol FA, preparada pela técnica de emulsificação espontânea livre de solvente, ao longo de 120 de armazenamento à 25°C ou à 8°C, foi avaliado.

Nas condições térmicas investigadas, nenhuma das formulações (n = 6) apresentou visualmente alteração de cor, odor ou a ocorrência de outros fenômenos indicadores de instabilidade do sistema, e.g., separação de fases, floculação, cremação, sedimentação, coalescência ou a maturação de Ostwald (Figura 11).

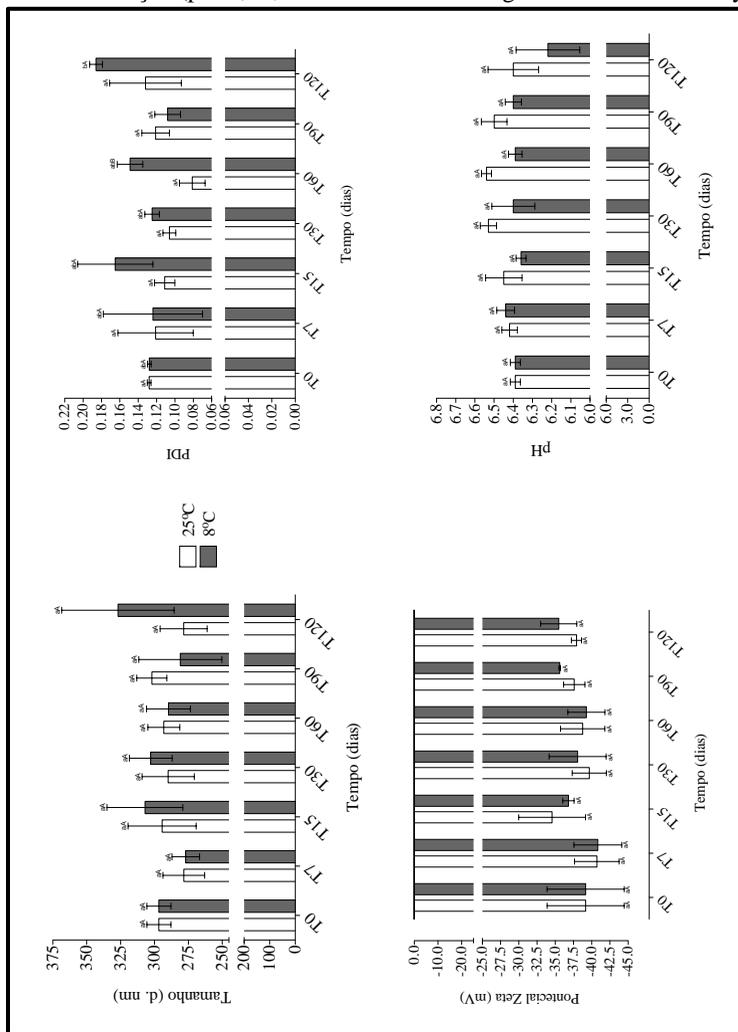
Figura 11 - Detalhe do aspecto homogêneo e coloração branca leitosa da nanoemulsão FA durante o estudo de estabilidade.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

As propriedades físico-químicas físicas monitoradas, em tempos pré-determinados, da nanoemulsão FA são apresentadas na Figura 12.

Figura 12 - Propriedades físico-químicas (tamanho de partícula, PDI, potencial zeta e pH) da nanoemulsão FA, no período de 120 dias de armazenamento à 8°C ou à 25°C. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento por formulação. Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as temperaturas de armazenamento para uma mesma formulação ( $p < 0,05$ ; ANOVA única via seguida do teste de Tukey).



Os parâmetros físico-químico diâmetro de partícula, PZ e pH da nanoemulsão FA não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nas condições térmicas ( $8^{\circ}\text{C}$  e  $25^{\circ}\text{C}$ ) estudadas, sugerindo a estabilidade do nanossistema desenvolvido. Os valores do PZ permaneceram acima de  $-34,567$  (valor em módulo), ao longo de 120 dias (Figura 12). As lecitinas, são de grande importância na estabilidade das emulsões a longo prazo, por conferirem um PZ final negativo à interface, o que permite a repulsão eletrostática entre as gotículas dispersas (BRUXEL et al., 2012). Segundo Codevilla e colaboradores (2015), o uso de tensoativos anfifílicos é o fator responsável pela estabilidade das nanoemulsões porque esses se posicionam entre as duas fases da emulsão (aquosa e oleosa), originando uma película interfacial que estabiliza o sistema. Já, o tensoativo poloxamer oferece estabilidade à formulação através de impedimento estérico, evitando a agregação de partículas finas no sistema coloidal (YAN et al., 2010). Esta nanoemulsão, desenvolvida sem uso de solvente orgânico, possui em sua formulação ambos os tensoativos, sendo a associação deles, a provável responsável pela estabilidade observada.

Quando a nanoemulsão FA foi conservada à temperatura ambiente, os valores de PDI não apresentaram variações significativas ( $p < 0,05$ ) ao longo do período. Porém, o armazenamento à  $8^{\circ}\text{C}$  determinou uma elevação estatisticamente significativa no valor desta variável ao final do experimento (Figura 12). Entretanto, independente da temperatura de armazenamento, a formulação FA permaneceu monodispersa.

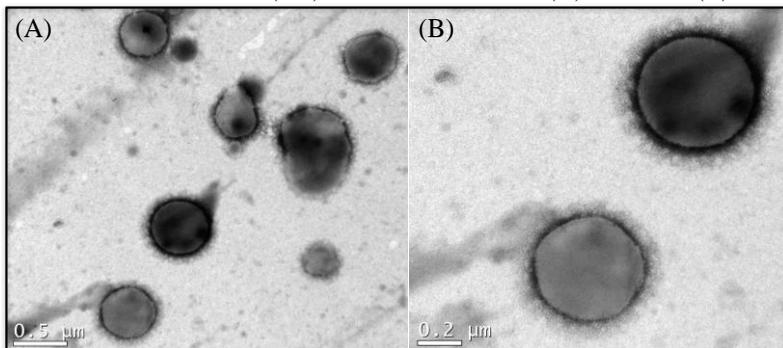
Apesar da alteração pontual do valor do índice de polidispersão no sexagésimo dia do estudo, é evidente que, de modo geral, as características físico-químicas da nanoemulsão FA não foram influenciadas pelas condições de estocagem. Neste contexto, tendo em vista as características físico-químicas satisfatórias do sistema, ausência da necessidade de solvente orgânico durante o preparo, estabilidade durante o armazenamento em temperatura ambiente e praticidade da técnica de preparação; a nanoemulsão FA (0,5% poloxamer + 0,25% lecitina + 1% carvacrol) foi selecionada para os experimentos posteriores de atividade biológica, passando a assumir a denominação de Nanoemulsão de Carvacrol (NC)

### **2.3 Avaliação morfológica da nanoemulsão de carvacrol**

A Figura 13 mostra a morfologia das nanopartículas poliméricas visualizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Essa

técnica tem sido muito empregada na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho de nanopartículas (SCHAFFAZICK et al., 2003). As micrografias revelam partículas de formato esférico, isoladas, com diâmetro similar ao observado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico.

Figura 13 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão da nanoemulsão de carvacrol (NC): aumento de 30.000x (A) e 60.000x (B).



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

## 2.4 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação do ativo

Após a validação de método analítico por espectrofotometria de UV-Vis de quantificação do carvacrol (Apêndice A), o teor e a eficiência de encapsulação da NC foram estimados e os resultados são mostrados na Tabela 7. A concentração de ativo no ultrafiltrado foi de 511, 69  $\mu\text{g/mL}$ , indicando que apenas uma fração reduzida não foi encapsulada. A alta EE do carvacrol observada pode resultar da baixa afinidade do ativo hidrofóbico pela fase aquosa externa da formulação. Os resultados demonstraram que o método de espectrofotometria de UV-Vis pode ser aplicado com sucesso na determinação do carvacrol nanoemulsionado.

Tabela 7 - Teor (mg/mL) e eficiência de encapsulação - EE (%) do carvacrol nas suspensões coloidais. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP\*), n = 3.

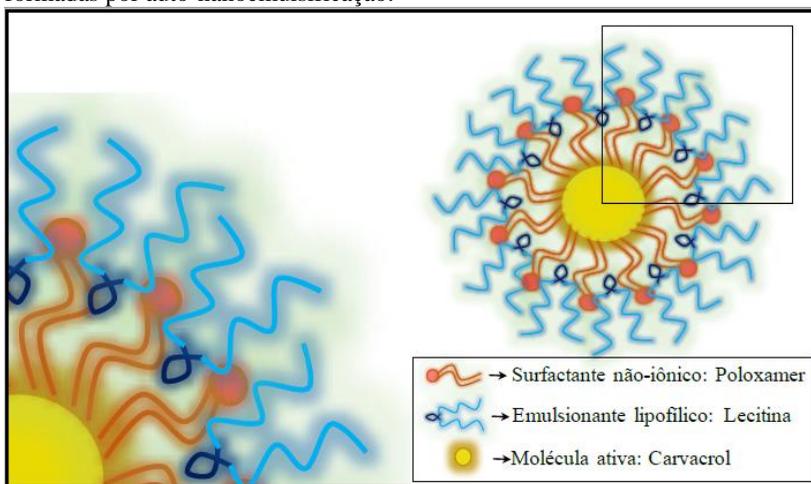
Amostra	Concentração de Carvacrol (mg/mL)		EE (%) $\pm$ DP*
	Adicionada	Mensurada $\pm$ DP*	
Nanoemulsão de Carvacrol	10	10,03 $\pm$ 0,12	94,90 $\pm$ 0,32

Os resultados obtidos mostram valores bastante superiores de EE, comparativamente aos relatados por Kotronia et al. (2017), aonde eficiências de inclusão variando de 22,60 a 25,53% em complexos de inclusão de  $\beta$ -ciclodextrina do óleo essencial de *Origanum onites* L, foram detectadas. Em estudo conduzido por Shakeri, Shakeri e Hojjatoleslami (2014), nanopartículas de polihidroxibutirato (PHB) contendo carvacrol foram preparadas pelos métodos de nanoprecipitação e diálise. A quantidade de carvacrol presente no sistema foi determinada e valores de EE de 21% e 11% foram encontrados pelos métodos de nanoprecipitação e diálise, respectivamente. De forma similar, no estudo de Iannitelli e pesquisadores (2011) a EE também foi baixa (26%) para as nanocápsulas de carvacrol revestidas com poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), assim como observado por Liolios e colaboradores (2009), i.e., 4,16% de EE de carvacrol incorporado em vesículas lipossomais. Baranauskaite e colaboradores (2018), ao prepararem lipossomas contendo extrato etanólico de orégano Turco (*O. onites* L.), pela técnica de sonicação, alcançaram EE entre 40,23  $\pm$  0,35% e 67,4  $\pm$  0,56%. Keawchaon e Yoksan (2011) obtiveram nanopartículas de quitosana contendo carvacrol utilizando método com duas etapas sequenciais (emulsificação óleo em água - O/A e gelificação iônica), porém com reduzida EE, i.e., 13,6 a 31,4%.

Resultados semelhantes ao observado neste estudo foram reportados por Ulloa et al. (2017), em estudo de microencapsulamento de timol e carvacrol em maltodextrina e proteína de soja. A alta EE do carvacrol variou entre 99,86 a 99,93% para maltodextrina e de 97,4 a 100% para proteína de soja. De forma semelhante, Santos e colaboradores (2015) obtiveram EE de 83,79 e 91,31% para os complexos de inclusão de carvacrol preparados com  $\beta$ -ciclodextrina, enquanto Sotelo-Boyás e colaboradores (2017) relatam alta eficiência de encapsulação de carvacrol em sistemas de nanopartículas (80,5%) e de nanocápsulas (81,4%) em quitosana.

Com base nos resultados apresentados, uma representação esquemática da NC é proposta na Figura 14, na qual o carvacrol encontra-se envolvido e estabilizado por uma camada formada pelos surfactantes não iônico (poloxamer) e anfifílico (lecitina).

Figura 14 - Representação esquemática das nanopartículas de carvacrol formadas por auto-nanoemulsificação.

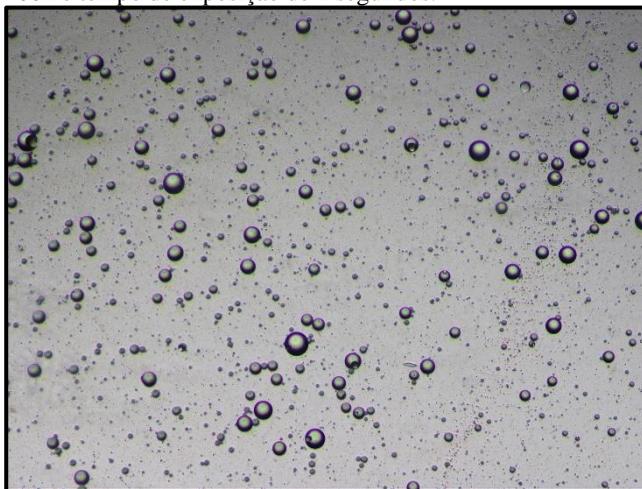


Fonte: Elaborado pela autora (2019).

## 2.5 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

Após a percepção da dificuldade de solubilização do carvacrol em meio de cultura, ensaios de solubilidade foram realizados conforme sugerido pelo guia da *Organisation for Economic Co-operation and Development* N<sup>o</sup>. 129 (OECD, 2010). Os ensaios basearam-se na tentativa de solubilização da substância teste em organosolventes a diferentes proporções, e.g. etanol e dimetilsulfóxido (DMSO) e o tensoativo Tween<sup>®</sup> 80. A aparente solubilização do carvacrol foi observada em todas as condições testadas, entretanto, a análise microscópica (microscópio Olympus<sup>®</sup> com câmera acoplada) permitiu detectar que a solubilização do ativo de consistência oleosa não era completa, permanecendo disperso em forma de gotículas que variavam de tamanho, conforme o tipo e a concentração de solvente usado. Para continuidade dos experimentos de viabilidade celular, a solução DMSO: carvacrol (v/v) foi selecionada, por apresentar maior número de gotículas do ativo livre com os menores tamanhos (Figura 15).

Figura 15 - Microscopia ótica de solução de carvacrol em DMSO. Aumento de 400x e tempo de exposição de 2 segundos.



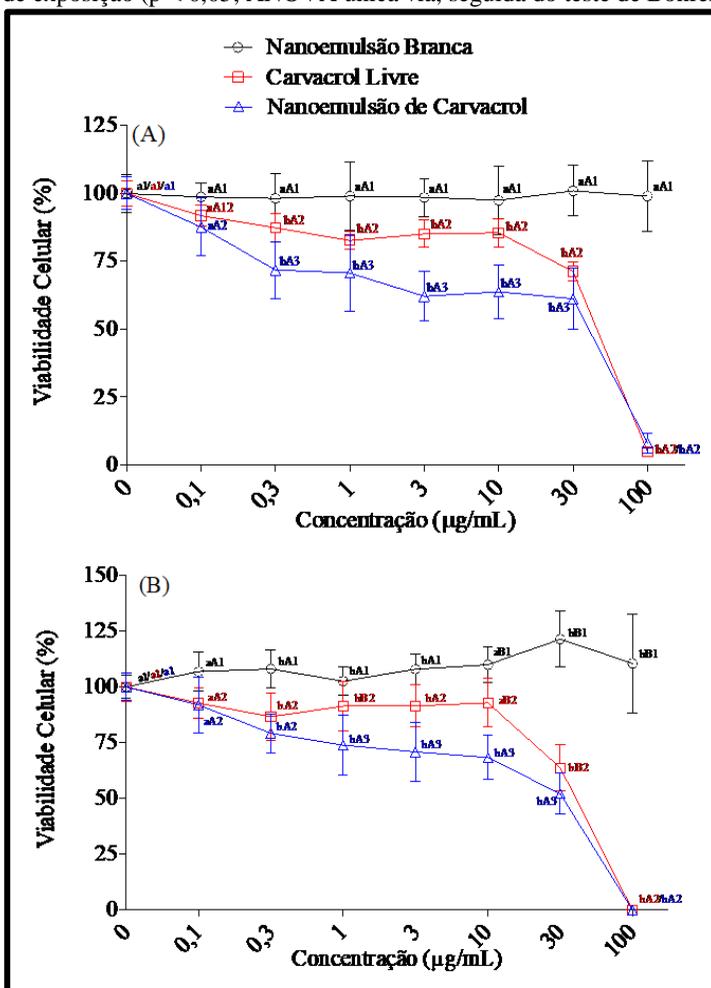
Fonte: Elaborado pela autora (2019).

O MTT (brometo de 3-[4, 5-dimetil-tiazol-2-il]-2, 5-difeniltetrazólio), é um sal de coloração amarela acumulado pelas células por endocitose. A redução enzimática do anel tetrazólico deste sal pelas mitocôndrias de células viáveis resulta na formação de cristais de formazan de cor violeta, que se concentram em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose. Os cristais são solúveis em DMSO e sua concentração pode ser determinada por espectrofotometria UV-Vis (MOSMANN, 1983). Os resultados da análise da citotoxicidade do ativo livre, da nanoemulsão de carvacrol (NC) e da nanoemulsão sem ativo (branca) com base no metabolismo do MTT em células de fibroblastos embrionários murino Balb/c 3T3 são mostrados na Figura 16.

O carvacrol livre nas concentrações até 10 µg/mL reduziu a viabilidade celular em 14,53% e 7,19% após 24 h e 48 h de exposição, respectivamente. Estes percentuais não foram considerados relevantes do ponto de vista do efeito citotóxico. Em contrapartida, a NC na mesma concentração, após 24 h e 48 h de exposição, reduziu a população celular em 36,28% e 31,67%, respectivamente. Após 24 h de exposição a 30 µg/mL de carvacrol, detectou-se uma redução de 28,78% na viabilidade celular, alcançando 36,28% nas 24 h seguintes. Frente a estes resultados, fica evidente que para este tipo celular que a NC a 30 µg/mL de nanoemulsão foi mais tóxica que o carvacrol livre, reduzindo

em 38,81% a viabilidade celular, após 24 h, e em 47,84% após 48 h de exposição. Os resultados de viabilidade celular da NC não podem ser atribuídos à presença de outros constituintes da formulação que não o ativo, uma vez que, nanoemulsões brancas foram avaliadas nas mesmas condições experimentais (concentrações e tempos de exposição), não causando efeito citotóxico (Figura 16).

Figura 16 - Viabilidade (%) de fibroblastos 3T3 após exposição de 24 h (A) e 48 h (B) ao carvacrol livre, à nanoemulsão de carvacrol (NC) e à nanoemulsão livre de ativo, determinada via ensaio de MTT. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre o controle (100% de viabilidade celular) e as concentrações testadas para um mesmo tratamento e tempo de exposição. Letras maiúsculas distintas representam diferença entre os tempos de exposição para um mesmo tratamento e concentração. Números distintos representam diferenças significativas entre os tratamentos para mesma concentração e tempo de exposição (p < 0,05; ANOVA única via, seguida do teste de Bonferroni).



Sobral-Souza et al. (2014) avaliando a citotoxicidade de 100 µg/mL carvacrol em culturas de fibroblastos NCTC929, pela técnica do vermelho neutro, detectaram redução de 21,62% da viabilidade celular, após 24 h de exposição. No presente estudo, a mesma concentração e período de exposição daquele ativo foram extremamente tóxicos às células 3T3, com redução superior a 95% da viabilidade celular (Figura 16).

Através de análise de regressão linear calculou-se a concentração inibitória de carvacrol livre e nanoemulsionado (em µg/mL) capaz de reduzir em 50% a viabilidade de fibroblastos 3T3 celular (IC<sub>50</sub>). Os valores são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores de IC<sub>50</sub> da nanoemulsão de carvacrol e de carvacrol livre para viabilidade de fibroblastos 3T3, após 24 h e 48 h de exposição. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (SEM), de três experimentos independentes. Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tempos de exposição para mesmo tratamento. Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos para mesmo tempo de exposição (p < 0,05, ANOVA única via).

Tratamento	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	
	24h	48h
Nanoemulsão de carvacrol	16,12 <sup>aA</sup> ± 5,92	18,78 <sup>aA</sup> ± 6,73
Carvacrol livre	34,05 <sup>aB</sup> ± 0.80	34.39 <sup>aB</sup> ± 5.11

Neste estudo, os valores da IC<sub>50</sub> dos testes de citotoxicidade para o carvacrol livre, independente do tempo de exposição, correspondem a, aproximadamente, o dobro dos valores da IC<sub>50</sub> para o ativo nanoemulsionado (Tabela 8). Os valores da IC<sub>50</sub> do carvacrol livre podem estar relacionados a grande dificuldade de solubilização deste monoterpeno em meio de cultura, mesmo após a realização dos ensaios de solubilidade. Não se encontrou solvente biocompatível que garantisse a completa solubilização do ativo. O ativo permaneceu disperso no meio de cultura na forma de gotículas microscópicas. É provável que as gotículas do ativo, de consistência oleosa, dispersas na solução não tenham entrado em contato direto com as células de fibroblastos 3T3 aderidas ao fundo dos poços da placa de cultivo.

O aumento do tempo de contato do ativo livre de 24 h para 48 h, com as células 3T3 não aumentou significativamente (p < 0,05) os valores da IC<sub>50</sub>. Esta informação pode, novamente, estar relacionada à baixa solubilidade do carvacrol, uma vez que com o passar do tempo, as gotículas do ativo podem ter coalescido, permanecendo na superfície do meio de cultura e não alcançando as células aderidas ao fundo da placa

de cultivo. Neste contexto, a insolubilidade do carvacrol pode ter corroborado com resultados de viabilidade celular e de  $IC_{50}$  que não refletem a real toxicidade do ativo em estudo. García-Salinas e demais pesquisadores (2018), avaliando os efeitos citotóxicos do carvacrol, do timol e do cinamaldeído em fibroblastos dérmicos humanos, queratinócitos epidérmicos humanos (HaCaT) e em monócitos humanos (THP1), observaram que a citotoxicidade dos compostos livres seria ainda mais reduzida na ausência de Tween<sup>®</sup> 80, devido ao seu caráter apolar.

É descrito na literatura que o processo de nanoencapsulamento de ativos hidrofóbicos é uma estratégia eficaz para aumentar a solubilidade em meio aquoso (BILIA et al., 2014). Logo, os valores de viabilidade celular e de  $IC_{50}$  encontrados no presente estudo podem resultar da eficaz solubilização, em meio de cultura DMEM, da NC. De fato, nesta situação é plausível assumir que as nanopartículas podem ter desempenhado a função de carreador do ativo, favorecendo seu contato direto com as células 3T3 aderidas ao fundo dos poços das placas de cultivo.

O fato da citotoxicidade após 48 h de exposição à NC não diferir significativamente ( $p < 0,05$ ) daquela observada após 24 h pode estar relacionado à cinética de liberação do ativo do interior das nanopartículas (Tabela 8). Estes resultados sugerem que o carvacrol foi totalmente liberado nas primeiras 24 h de incubação, período em que atingiu seu potencial citotóxico máximo.

Chen et al. (2009) relatam que o carvacrol puro em concentrações superiores a 28  $\mu\text{g/mL}$  é tóxico e causa a morte de fibroblastos 3T3 de camundongos. De outra forma, a linhagem celular exposta por 24 h a nanopartículas de quitosana contendo o ativo modificado, i.e., carvacrol aldeído na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ , apresentou viabilidade superior a 80%. Diferentemente do que foi observado no presente estudo, segundo os autores referenciados as nanopartículas contendo carvacrol aldeído determinaram uma citotoxicidade significativamente mais baixa em relação ao carvacrol isolado e não modificado quimicamente.

A literatura apresenta maior frequência de relatos de estudos do potencial citotóxico do carvacrol e dos OE que contém esse ativo como um dos constituintes majoritários sobre células tumorais. Como exemplo, o efeito citotóxico do carvacrol em células de câncer de colo do útero humano, pelo ensaio MTT, após 48 h de tratamento, inibiu a proliferação de células SiHa e HeLa, com  $IC_{50}$  de  $50 \pm 3,89 \mu\text{g/mL}$  e  $50 \pm 5,95 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente (MEHDI et al., 2011). Estes valores são próximos daqueles observados por Özkan e Erdoğan (2011) para o carvacrol livre, i.e.,  $IC_{50}$  de 53,09  $\mu\text{g/mL}$ . De forma similar, Coccimiglio et al. (2016) ao avaliarem a citotoxicidade do extrato etanólico de

*Origanum* spp., após 24 h de exposição de células epiteliais de adenocarcinoma de pulmão humano (A549), observaram diminuição na viabilidade celular dependente da concentração (ensaio de MTT). Após 24 h de tratamento das células com 31,3 µg/mL, a viabilidade celular foi inferior a 25% e a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) igual a 14 µg/mL.

No presente estudo, diferentemente do reportado às células cancerígenas, é de interesse que o produto tecnológico desenvolvido a partir do carvacrol seja de baixa citotoxicidade, visando menores riscos à saúde humana em caso de contato acidental. Chama a atenção que das referências aqui citadas e que tinham por objetivo avaliar a citotoxicidade dos OE ou do carvacrol isolado, apenas uma (GARCÍA-SALINAS et al., 2018) fez menção ao mecanismo empregado à solubilização dos ativos hidrofóbicos. Provavelmente, a variação nos resultados reportados naqueles estudos e os resultados descritos neste trabalho decorra, em alguma extensão, do uso de métodos distintos à solubilização dos ativos nos meios de cultivo e do emprego de tipos celulares e de técnicas de avaliação da viabilidade celular diferentes.

## 2.6 Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*

### 2.6.1 Avaliação da sensibilidade das cepas frente a antibióticos

Para controle da sensibilidade das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), os perfis de sensibilidade foram determinados pelo método de disco difusão, frente a diferentes antibióticos e são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Diâmetro médio (mm) dos halos de inibição das cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) frente a antibióticos. Resultados apresentados como média ± desvio padrão (n = 3).

Controle Positivo	Sensibilidade Norma M100-S16 (CLSI, 2006)	Halo de Inibição (mm)		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Clindamicina 2 µg	S ≥ 21	24,75 ± 1,06	n.d.	n.d.
Eritromicina 15 µg	S ≥ 23	27,16 ± 1,04	n.d.	n.d.
Gentamicina 10 µg	S ≥ 15	24,33 ± 0,58	n.d.	16,67 ± 0,76
Ciprofloxacina 5 µg	S ≥ 21	n.d.	33,67 ± 2,08	33,00 ± 1,00
Ampicilina 10 µg	S ≥ 17	n.d.	28,33 ± 1,15	n.d.
Sulfonamidas 300 µg	S ≥ 17	n.d.	29,00 ± 0,00	n.d.

Legenda: S = Sensível; n.d. = não determinado.

As cepas bacterianas testadas mostraram-se sensíveis a pelo menos dois antibióticos, i.e., *S. aureus* foi sensível à clindamicina, a eritromicina e a gentamicina, enquanto *S. typhimurium* mostrou-se sensível a ciprofloxacina, ampicilina e as sulfonamidas. A *P. aeruginosa* apresentou sensibilidade aos antibióticos ciprofloxacina e gentamicina (Tabela 9).

### 2.6.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os resultados da determinação da CIM da nanoemulsão de carvacrol (NC) e do carvacrol livre contra as cepas bacterianas de interesse (*S. aureus*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*), após contato com o ativo livre e com a nanoemulsão de carvacrol (NC), determinado via ensaio de microdiluição de caldo (norma M7-A7, CLSI, 2006), com modificações, são apresentados na Tabela 10. Os resultados dos controles de 100% de crescimento microbiano indicam que os veículos (nanoemulsão branca ou Tween<sup>®</sup> 80) não demonstraram atividade antimicrobiana frente às cepas testadas (dados não apresentados). Os valores da CIM dos antibióticos comerciais (Tobramicina 0,3% - Neo Química<sup>®</sup> e Sulfato de Gentamicina 0,5% - Allergan<sup>®</sup>), para as cepas bacterianas (*S. aureus*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*), foram inferiores aos valores de CIM preconizados pela norma M100-S16 do CLSI (CLSI, 2006). Estes resultados confirmam a sensibilidade das cepas frente aos controles de inibição do crescimento microbiano empregados no presente estudo (dados não apresentados).

Tabela 10 - Concentração inibitória mínima (CIM) da nanoemulsão de carvacrol e do carvacrol livre, frente à cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), determinada pelo método de microdiluição em caldo.

Tratamento	CIM (µg/mL)		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Carvacrol Livre	250	250	1000
Nanoemulsão de Carvacrol	125	250	500

O valor da CIM determinado para *S. aureus* e para *P. aeruginosa*, após exposição a NC, foi a metade do valor observado após a exposição das cepas ao carvacrol livre (Tabela 10). Estes resultados sugerem que a atividade antimicrobiana da NC, além de estar relacionada ao mecanismo de ação do ativo sobre as membranas celulares dos

microrganismos, também foi influenciada pelo encapsulamento do ativo, que melhorou a solubilidade e a estabilidade deste antimicrobiano. As características físico-químicas da nanopartícula formada (quantidade de ativo encapsulada, composição, tamanho e carga da nanopartícula) também podem ter favorecido para a redução da CIM para essas bactérias. Segundo Prakash e colaboradores (2018), devido ao tamanho reduzido, as nanopartículas carreadoras de óleos essenciais aumentam a área de superfície por unidade de volume, favorecendo uma interação mais eficiente com a membrana celular bacteriana.

Assim como no presente estudo, outros pesquisadores também referem que o encapsulamento de ativos antimicrobianos proporciona melhora da atividade biológica, com consequente redução dos valores da CIM. Após preparar complexos de inclusão de carvacrol em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HPBCD), Santos et al. (2015) e Kamimura et al. (2014) avaliaram a eficácia antimicrobiana contra *E. coli* K12 e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium LT2, respectivamente. Segundo os autores, a atividade antimicrobiana do composto complexado com HPBCD foi superior em relação ao carvacrol livre, previamente solubilizado em etanol e emulsionado em Tween<sup>®</sup> 20, para ambas as bactérias. Os resultados indicam que o processo de complexação do composto aumentou a solubilidade do ativo em água e, consequentemente, aumentou o contato do ativo com as bactérias dispersas no meio de cultivo.

Para a cepa *S. typhimurium* não foi observada diferença entre os valores da CIM para os tratamentos (Tabela 10), sugerindo que o processo de encapsulamento não interferiu na atividade antimicrobiana. De interesse, ressalta-se que a semelhança de valores da CIM para ativos livres e nanoencapsulados também é relatada por outros autores (ENGEL et al., 2017; PAN et al., 2014; WATTANASATCHA, RENGPIPAT, WANICHWECHARUNGRUANGA, 2012) para diversas espécies bacterianas. Apesar disso, no presente estudo, os valores de CIM observados para *S. typhimurium* para o carvacrol livre e a NC (Tabela 10) foram inferiores comparativamente à CIM daquele monoterpeno (312  $\mu\text{g/mL}$ ) determinada por Trevisan e colaboradores (2018) contra *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium. Cabe ressaltar ainda, que para todas as cepas testadas, nas concentrações abaixo da CIM (Tabela 10), a NC apresentou maior atividade antimicrobiana quando comparado ao carvacrol livre.

De maneira geral, os valores da CIM determinados neste estudo, tanto para a NC quanto para o ativo livre, foram inferiores quando

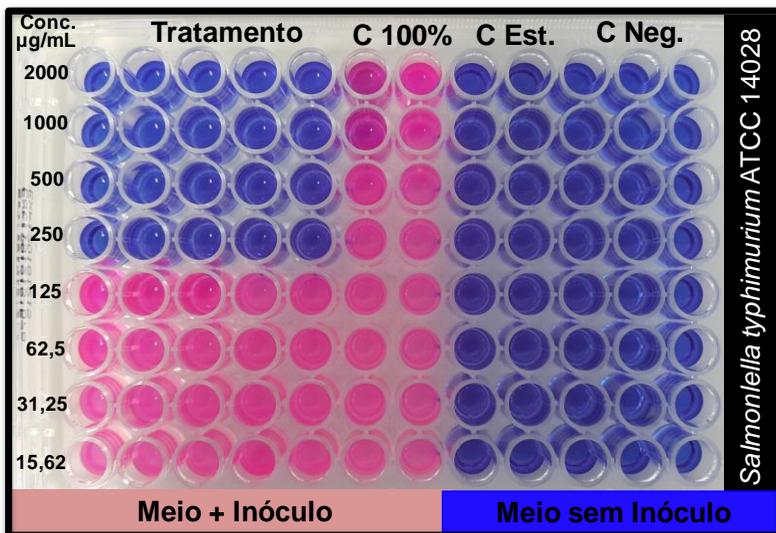
comparados aqueles observados por outros pesquisadores, que empregaram metodologias distintas (MILADI et al., 2017; CHO; LEE, 2014; KEAWCHAOON; YOKSAN, 2011; DAL POZZO et al., 2011) e outras espécies/estirpes bacterianas.

Ainda, considerando os valores de CIM, tanto a NC como o ativo livre demonstraram maior potencial antimicrobiano contra *S. aureus* em comparação à *S. typhimurium* e *P. aeruginosa* (Tabela 10). Assim, constata-se que a inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas revelou serem estas mais sensíveis aos tratamentos, comparativamente àquelas Gram-negativas. A menor susceptibilidade destas últimas a compostos hidrofóbicos pode estar relacionada à presença da camada lipopolissacarídica da membrana celular externa, é responsável por limitar ou restringir a difusão dos compostos ao meio intracelular (MARINELLI; STEFANO; CACCIOATORE, 2018; ROSA et al., 2015; KEAWCHAOON; YOKSAN, 2011; GUARDA et al., 2011). Segundo Rosa et al., (2015) e Guarda et al., (2011), nestes microrganismos seria necessária uma maior concentração de ativo hidrofóbico antimicrobiano para se obter o mesmo efeito observado nas bactérias Gram-positivas. Em contraste, a membrana externa não está presente nas bactérias Gram-positivas, nestas o carvacrol age diretamente sobre a membrana citoplasmática promovendo a expansão e a ruptura da estrutura da bicamada fosfolipídica, causando extravasamento de material celular como íons, trifosfato de adenosina (ATP) e ácido nucléico. Dependendo da extensão do dano induzido na membrana citoplasmática, o composto lipofílico antimicrobiano pode determinar a morte celular (MARINELLI; STEFANO; CACCIOATORE, 2018; SYED; SARKAR, 2018; KEAWCHAOON; YOKSAN, 2011; NOSTRO et al., 2007). Nessa lógica, Guarda e colaboradores (2011) demonstraram que bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* O157:H7 foi mais resistente ao carvacrol (CIM de 375 ppm) do que as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Listeria innocua* (CIM de 225 ppm). Por sua vez, Engel et al. (2017), avaliando a atividade antimicrobiana do carvacrol e do timol livres e de lipossomas contendo carvacrol/timol simultaneamente, obtiveram resultados discrepantes em relação ao observado no presente estudo. Os pesquisadores demonstraram que a bactéria Gram-negativa *Salmonella enterica* foi mais sensível (CIM de 0,331 mg/mL) que *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) (CIM de 0,662 mg/mL).

Por fim, os resultados da CIM do ativo livre e da nanoemulsão de carvacrol contra as cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Pseudomonas aeruginosa*

(ATCC 15442) foram confirmados pela reação com o revelador resazurina (100 µg/mL), conforme ilustração abaixo (Figura 17).

Figura 17 - Representação visual da concentração inibitória mínima (CIM) da nanoemulsão de carvacrol contra *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), revelada com o uso de resazurina.



Legendas: Conc. = Concentração de ativo em µg/mL; Tratamento = Nanoemulsão de carvacrol; C 100% = Controle de 100% de crescimento do inóculo (meio de cultivo contendo inóculo tratado com nanoemulsão branca); C Est. = Controle de esterilidade do meio e do ensaio; C Neg. = Controle negativo (meio de cultivo contendo nanoemulsão de carvacrol). Fonte: Elaborado pela autora (2019).

A resazurina é um corante metabólico comumente usado como indicador de oxirredução em ensaios de viabilidade celular. Tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, incluindo células bacterianas. O mecanismo de ação baseia-se na redução da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona10-óxido) (cor púrpura) em resarufina (cor rósea), na mitocôndria. A presença de cor azul indica ausência de crescimento bacteriano, enquanto a cor rosa representa a ocorrência de crescimento bacteriano. No presente estudo, a CIM foi considerada a concentração imediatamente acima da primeira concentração com presença de crescimento bacteriano (coloração rosa) (O'BRIEN et al., 2000; MANN; MARKHAM, 1998). Destaca-se que os valores da CIM obtidos, conforme Gudiña et al. (2010), para todos os

tratamentos e cepas do estudo foram confirmados através do ensaio colorimétrico empregando-se a resazurina.

Independente dos valores distintos de CIM acima referenciados, a ação antimicrobiana dos OE contendo carvacrol, do carvacrol nanoencapsulado e do ativo livre fica bem documentada e os resultados do presente estudo são mais uma forte evidência que corrobora com as pesquisas já realizadas.

Segundo Ryu e pesquisadores (2018), para uma nanoemulsão antimicrobiana ser comercialmente viável esta deve ter boa estabilidade a longo prazo, forte atividade antimicrobiana e ser formulada com a quantidade mínima de matérias-primas. Neste contexto, a NC desenvolvida apresenta-se como uma promissora alternativa para uso em procedimentos de sanitização ou desinfecção, uma vez que:

- a) permaneceu estável, em temperatura ambiente, durante pelo menos 90 dias de armazenamento;
- b) ao seu desenvolvimento foi necessário o emprego de reduzida quantidade e variedade de matérias-primas e, ainda;
- c) demonstrou forte atividade antimicrobiana, principalmente, contra *S. aureus* e *S. typhimurium*.

## **2.7 Avaliação do potencial desinfetante da nanoemulsão de carvacrol**

### **2.7.1 Validação do método de diluição/neutralização**

Os ensaios conduzidos para investigar a ausência de qualquer efeito letal das condições experimentais, sem o produto desinfetante em teste, revelaram que as condições padronizadas para a condução do método de interesse não foram nocivas às cepas bacterianas testadas, porque a densidade populacional bacteriana atendeu aos critérios de validação estipulados pela norma europeia (EUROPEAN STANDARD 1040:2005).

Neste estudo, assim como no estudo de Langsrud e Sundheim (1998), concluiu-se que o caldo neutralizante D/E (Acumedia<sup>®</sup>), empregado como solução neutralizante da NC, do ativo livre e do hipoclorito de sódio não foi tóxico para células de *S. aureus* (ATCC 6538) e de *P. aeruginosa* (ATCC 15442) pois, novamente, a densidade populacional permaneceu dentro dos critérios de validação estipulados pela norma europeia (EUROPEAN STANDARD 1040:2005).

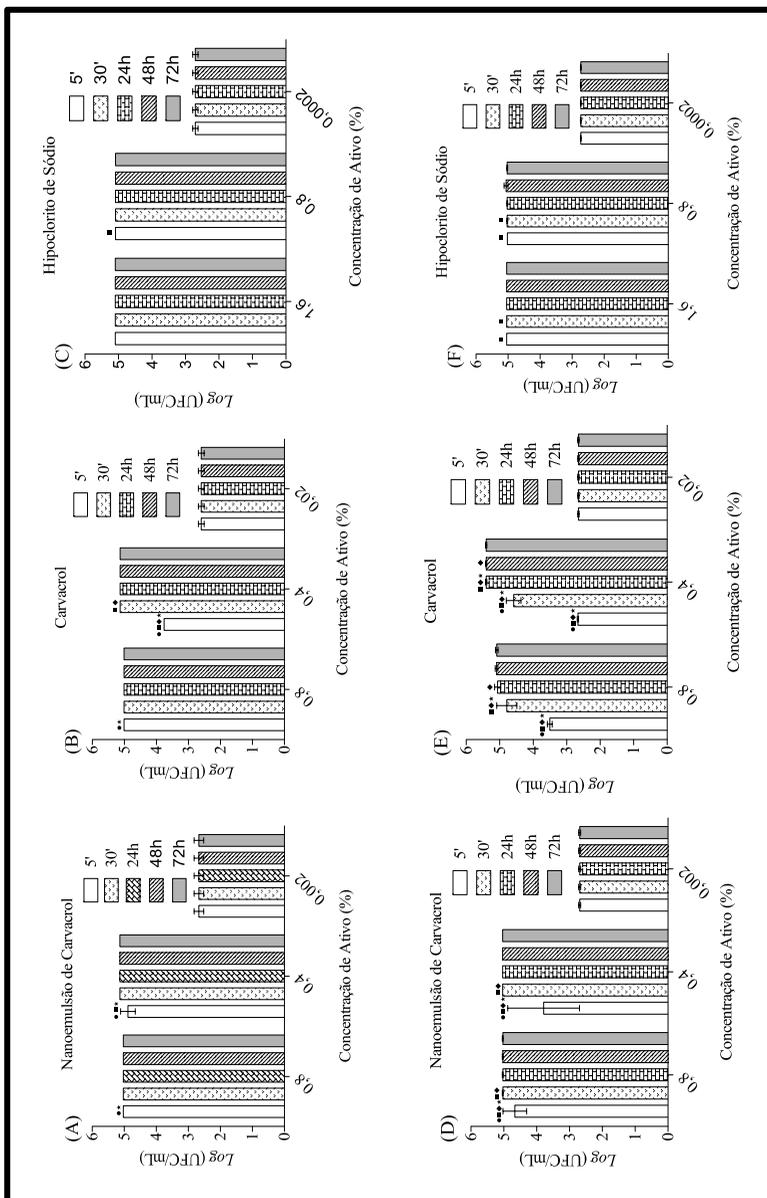
O caldo neutralizante D/E empregado foi capaz de inativar o efeito bactericida da NC, do carvacrol livre e do hipoclorito de sódio, na maior concentração testada, após os tempos de exposição empregados neste estudo (EUROPEAN STANDARD 1040:2005). O caldo

neutralizante D/E foi desenvolvido por Dey e Engley para neutralizar um amplo espectro de desinfetantes e preservantes antimicrobianos, incluindo compostos de amônio quaternário, fenólicos, iodo, preparações contendo cloro, mercúrio, formaldeído e glutaraldeído. O meio neutralizante D/E neutraliza altas concentrações de resíduos de antimicrobianos quando comparado com outras formulações padrões para o mesmo fim, tais como o meio Lethen, Tioglicolato e Tampão Neutralizante (DEY; ENGLELY, 1995; DEY; ENGLELY, 1994; DEY; ENGLELY, 1983). Segundo Langsrud e Sundheim (1998), o aumento da concentração de tiosulfato de sódio na solução neutralizante pode aumentar seu efeito neutralizante. Estes autores também afirmam que a lecitina incorporada à formulação do neutralizante D/E é importante para a inativação do desinfetante químico cloreto de benzalcônio. O meio caldo neutralizante D/E (Acumedia<sup>®</sup>) empregado neste estudo apresenta em sua composição tanto tiosulfato de sódio quanto lecitina. Segundo a Acumedia<sup>®</sup> (ACUMEDIA, 2010), produtor do meio neutralizante empregado neste estudo, o constituinte tiosulfato de sódio é responsável pela neutralização do iodo e do cloro, enquanto que, o polissorbato 80 neutraliza fenóis (a exemplo do carvacrol), hexaclorofenos e formalina e a lecitina é responsável por neutralizar compostos de amônio quaternário.

### 2.7.2 Método de diluição/neutralização

Os resultados do teste de atividade bactericida pelo método de diluição/neutralização são apresentados na Figura 18 para cada microrganismo e tratamento testados.

Figura 18 - Logaritmo da redução da viabilidade (UFC/mL) de *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 15442 (A, B e C) e de *Staphylococcus aureus* - ATCC 6538 (D, E e F), consoante aos tempos exposição à nanoemulsão de carvacrol (NC), ao carvacrol livre e ao hipoclorito de sódio. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). Asteriscos indicam diferenças significativas entre cepas bacterianas para um mesmo tratamento, concentração e tempo de exposição. Quadrados indicam diferenças significativas entre tratamentos para uma mesma concentração, tempo de exposição e bactéria. Losangos indicam diferenças significativas entre os tempos de um mesmo tratamento para mesma concentração e bactéria. Estrelas indicam diferenças significativas entre concentrações um mesmo tratamento para mesmo tempo de exposição e bactéria (p < 0,05; ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni).



O protocolo que descreve o método de diluição/neutralização (EN 1040:2005) determina que para ser demonstrada a eficácia do produto com ação antimicrobiana desinfetante é necessária a redução da densidade populacional do inóculo inicial de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) em, no mínimo, cinco unidades logarítmicas ( $5 \log$  UFC/mL), após os tempos de contato com o tratamento em teste (EUROPEAN STANDARD 1040:2005).

Na maior concentração testada (0,8%), a NC inativou as duas cepas padrões, o que foi constatado pela ausência de crescimento microbiano nas placas semeadas. Entretanto, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as cepas quanto ao tempo de contato necessário à ação bactericida, com maior requerimento de tempo (30 min) para *S. aureus* (Figura 18 - D) em relação a *P. aeruginosa* (5 min) (Figura 18 - A). Na concentração de 0,4%, a NC também inativou as duas cepas padrões sem, no entanto, haver diferença ( $p < 0,05$ ) quanto ao tempo de contato necessário (30 min) para tal efeito (Figura 18 - A e D). Entretanto, ressalta-se que para esta última concentração, após cinco minutos de exposição da suspensão de *P. aeruginosa* a NC, a redução da densidade populacional do inóculo inicial foi de  $4,889 \pm 0,23 \log$  UFC/mL, ou seja, muito próxima às cinco unidades logarítmicas requeridas pela norma europeia para a comprovação da ação antimicrobiana desinfetante (Figura 18 - A). Pode-se notar que a NC foi eficaz, tanto contra *S. aureus* quanto contra *P. aeruginosa*, mesmo em uma concentração mais baixa (0,4%) requerendo, entretanto, um maior tempo de contato (30 min).

O ativo livre também foi capaz de inativar as duas cepas padrão testadas e na maior concentração (0,8%) os resultados foram semelhantes aos encontrados para a NC, uma vez que, também foi observada diferença quanto ao tempo de contato necessário à inativação das cepas. Entretanto, diferentemente do observado com a NC, empregando-se 0,4% de ativo livre, houve diferença ( $p < 0,05$ ) quanto ao tempo de contato necessário à ação bactericida entre as cepas testadas (Figura 18 - B e D).

Para *P. aeruginosa*, a ação bactericida da NC e do ativo livre parecem estar relacionadas à concentração do tratamento testado, uma vez que, quanto maior a concentração testada (0,8%), menor o tempo de contato necessário (5 min) para o tratamento reduzir a densidade populacional do inóculo inicial a menos  $5 \log$ , demonstrando sua eficácia antimicrobiana desinfetante, conforme a norma europeia (Figura 18 - A e B). Este aspecto é particularmente importante e desejável, já

que em condições reais de trabalho é difícil acreditar que tempos prolongados de contato serão respeitados pelos usuários dos produtos antimicrobianos em procedimentos de sanitização e/ou desinfecção.

O efeito bactericida sobre *S. aureus* da NC parece ser tempo dependente, uma vez que necessita de menor tempo de contato (30 min) quando comparado ao ativo livre que, mesmo na maior concentração testada (0,8%), exigiu pelo menos 24 horas de contato para a inativação do crescimento microbiano no nível preconizado pela norma europeia (Figura 18 - D e E). De fato, mesmo na menor concentração testada (0,4%) a NC reduziu drasticamente o tempo de contato necessário à inativação do crescimento de *S. aureus* para, no máximo, de 30 minutos, quando comparado ao ativo livre.

Para fins de comparação, a atividade desinfetante do hipoclorito de sódio de uso comercial também foi avaliada, entretanto, em concentrações duas vezes superiores àquelas da NC e de carvacrol livre. O hipoclorito de sódio a 0,8% e 1,6% inibiu o crescimento dos dois microrganismos, confirmando-se a efetividade da ação desinfetante do produto analisado em todos os tempos de contato com as cepas (Figura 18 - C e F). Entretanto, segundo Reis e colaboradores (2011), desinfetantes contendo iodo e cloro devem permanecer protegidos da ação da luz ultravioleta e calor, pois estes degradam os referidos compostos, reduzindo seus efeitos bacteriostático e bactericida. Segundo os mesmos autores, o hipoclorito de sódio aplicado sobre uma superfície apresenta uma eficiência média de 24 h, devido à volatilização do cloro e à ação inativadora da radiação luminosa do ambiente (LANDRY et al., 2015).

Na maior concentração testada (0,8%), a atividade antimicrobiana desinfetante da NC contra *P. aeruginosa* foi semelhante ao observado com o hipoclorito de sódio comercial a 1,6%, em todos os tempos testados. A partir de 30 min de exposição da suspensão de *P. aeruginosa* à NC a 0,4%, constatou-se atividade bactericida semelhante ao tratamento com hipoclorito de sódio a 1,6% após cinco minutos de contato com a suspensão bacteriana (Figura 18 - A e C).

Após 30 minutos de contato da NC a 0,8% com a suspensão bacteriana de *S. aureus*, a redução da densidade populacional do inóculo ( $5,035 \log$  UFC/mL) foi semelhante ao observado após 5 min de contato da suspensão bacteriana com o hipoclorito de sódio a 1,6% ( $5,045 \log$  UFC/mL) (Figura 18 - D e F).

Nas menores concentrações testadas, nenhum dos tratamentos (NC, carvacrol livre e hipoclorito de sódio comercial) promoveu a redução da densidade populacional do inóculo inicial de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) em,

no mínimo 5 *log*, para os tempos de contato testados (Figura 18 - A, B, C, D, E e F). Portanto, nestas concentrações, os tratamentos não apresentaram a eficácia desinfetante comprovada, consoante à norma europeia de referência.

Com o objetivo de avaliar a atividade bactericida de três desinfetantes, dentre eles o hipoclorito de sódio, sobre a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e 21 isolados meticilina resistente, seguindo o protocolo do CEN (EUROPEAN STANDARD 1040:2005), Avancini e Both (2017) constataram que o desinfetante hipoclorito de sódio a 0,0025% (25 ppm) inativou a cepa padrão, após 5 min de contato. No presente estudo, em atendimento aos critérios de validação requeridos pelo protocolo europeu, na concentração de 0,00025% (2,5 ppm) o desinfetante hipoclorito de sódio não inativou a cepa padrão, resultando em um valor de logaritmo da redução da densidade populacional do inóculo inicial de  $2,731 \pm 0,01$  *log* UFC/mL para todos os tempos de exposição.

Sow e colaboradores (2017), após desenvolverem por *ultrassonificação* uma nanoemulsão contendo carvacrol, avaliaram a atividade antimicrobiana desta, combinada ou não, com água eletrolisada ácida contra *Escherichia coli* (ATCC 25922) e a levedura *Pichia pastoris* (GS115) em repolhos picados. A atividade antimicrobiana da nanoemulsão de carvacrol (0,5% - m/m) foi comprovada a partir dos resultados da inibição do crescimento (3 *log* UFC/mL) de ambos microrganismos, comparativamente ao controle (água deionizada). Quando a nanoemulsão foi combinada com água eletrolisada ácida, a atividade antimicrobiana aumentou em 0,4 e 0,6 *log* para *E. coli* e *P. pastoris*, respectivamente.

Engel e colaboradores (2017) avaliaram a ação desinfetante de soluções etanólicas de timol e carvacrol e de lipossomas contendo carvacrol/timol sobre *pools* de *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus* aderidos ao aço inoxidável (AISI 304). Após exposição dos corpos de aço aos *pools* bacterianos a aderência dos microrganismos foi de 5,5 a 6,5 *log* UFC/cm<sup>2</sup>. O *pool* de *S. aureus* foi inibido ( $\pm 6,1$  *log* CFU/cm<sup>2</sup>) após um minuto de contato utilizando-se timol ou carvacrol na CIM de 0,662 mg/mL. A inibição total de *Salmonella* spp. ( $\pm 5,94$  *log* UFC/cm<sup>2</sup>) somente ocorreu após 10 min com os ativos antimicrobianos livres, na CIM de 0,331 mg/mL. Os lipossomas contendo carvacrol/timol exigiram 10 min de contato à inativação de *S. aureus* e *Salmonella* spp. Estes resultados contrastam com o observado no presente estudo, onde a NC inativou *S. aureus* em menor tempo de contato em relação ao ativo livre (Figura 18 - D e E).

Microrganismos organizados em biofilme demonstraram uma

susceptibilidade decrescente a desinfetantes clássicos. Neste sentido, Campana e Baffone (2018) avaliaram o efeito de carvacrol sobre biofilmes em placas de aço inoxidável de *Escherichia coli* O157: H7 (ATCC 35150), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43387), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Candida albicans* (ATCC 14053). Após 30 s, 5 e 15 min de tratamento com 1% (v/v) de carvacrol, quantificou-se o número de células viáveis em placa. Comparado ao controle não tratado, o tratamento com carvacrol por 15 min induziu uma redução logarítmica igual ou superior a 3 para todos os biofilmes testados. Adicionalmente, os autores observaram que o carvacrol foi mais efetivo em menor tempo de contato contra o biofilme de *P. aeruginosa* (ATCC 9027) em relação a *S. aureus* (ATCC 43387), similar ao observado no presente estudo. De fato, tanto a NC quanto o ativo livre promoveram uma redução logarítmica igual ou superior a 5, em menor tempo de contato, contra *P. aeruginosa* (ATCC 15442) comparativamente a *S. aureus* (ATCC 6538) (Figura 18 - A e D) (Figura 18 - B e E).

Os resultados deste trabalho confirmam que o carvacrol é um composto eficaz ao controle de diversas espécies de microrganismos. Os achados apresentados suportam, ainda, a possibilidade de uso deste produto natural para formular novos sanitizantes e/ou desinfetantes, a exemplo da NC desenvolvida. O processo de nanoencapsulação empregado aumentou, significativamente, a estabilidade e a solubilidade do carvacrol e gerou um produto de fácil aplicação em meio aquoso com acentuada a ação bactericida e potencial desinfetante. Entretanto, para efetividade dos antissépticos e desinfetantes, faz-se necessário que se tenha conhecimento sobre as reais condições de ação desses produtos (REIS et al., 2011). A eficácia de um produto desinfetante pode sofrer a interferência dos materiais que compõem a superfície onde encontram-se alojados os microrganismos a que sua aplicação está destinada (AVANCINI; WIEST, 2008). Assim, em superfícies com maior porosidade, os microrganismos têm maior probabilidade de permanecerem albergados e protegidos. Segundo Spaulding (*apud* AVANCINI; WIEST, 2008) a presença de matéria orgânica como sangue, plasma e fezes pode inativar o desinfetante, ou servir como barreira mecânica protetora dos microrganismos. Assim, uma área pode necessitar ser esfregada e lavada antes do desinfetante ser aplicado sob o risco de ter sua ação microbiológica diminuída na presença de matéria orgânica (REIS et al., 2011). Além disso, a decisão quanto ao critério tempo de contato necessário a redução e/ou eliminação dos microrganismos deve ser baseado no monitoramento da suscetibilidade

e sensibilidade da amostra/linhagem presente em cada cenário de situação-problema e não unicamente em cepas padronizadas (MACIEL et al., 2017). Outros fatores intrínsecos aos microrganismos contaminantes, e.g., tipo e nível de contaminação microbiana e capacidade de formar biofilmes, também podem afetar a eficácia da desinfecção (AVANCINI; BOTH, 2017).

Pelos motivos acima expostos, para que se possa efetivamente utilizar a NC como uma alternativa à sanitização ou desinfecção convencionais, empregando-se a mesma metodologia (EN 1040:2005), é necessário aprofundar o conhecimento sobre seu potencial desinfetante sobre outros microrganismos patogênicos. Na sequência, a NC deve ser submetida as demais fases da EN 14885:2015 para testes de desinfetantes e antissépticos químicos proposto CEN, sendo, assim, avaliada quanto à capacidade de eliminar os microrganismos em suspensão, na presença de substâncias interferentes (matéria orgânica) (fase 2/etapa 1) e (EUROPEAN STANDARD 1276:2015). Na fase 2/etapa 2 a NC deverá ser submetida a ensaios de superfície (discos de aço inox impregnados com microrganismos) que simulam as condições reais de aplicação. Dessa forma, a NC pode ser analisada em diferentes situações e em condições simuladas que se aproximam um pouco mais da realidade, o que pode tornar a avaliação mais precisa em relação à situação real de seu uso como um produto desinfetante.

**CAPÍTULO 3: SOLUÇÕES ETANÓLICAS CONTENDO  
NANOEMULSÃO DE CARVACROL**

---



Antissépticos e desinfetantes são componentes essenciais das práticas de controle prevenção de infecções (GARGI, et al., 2017). De acordo com a classificação do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), os álcoois são considerados antissépticos e desinfetantes de nível intermediário (GRAZIANO et al., 2013; VENTURELLI et al., 2009). Particularmente, os álcoois etílico e isopropílico (2-propanol), em concentrações entre 50 e 80% (v/v), são amplamente utilizados nas práticas em saúde como antisséptico da pele de pacientes, na higienização das mãos de cuidadores e como desinfetante de artigos e superfícies (ANDRADE et al., 2007; PAIVA; MURAI, 2005). A atividade antimicrobiana dos álcoois deve-se à desnaturação de proteínas e a dissolução de gorduras, podendo lesar a membrana celular (VENTURELLI et al., 2009; PAIVA; MURAI, 2005). Entretanto, na presença de matéria orgânica aderida à superfície, a atividade desinfetante não é efetiva. A matéria orgânica funciona como uma barreira mecânica à ação do álcool sobre os microrganismos (VENTURELLI et al., 2009). Por este motivo, a recomendação clássica e consensual de métodos seguros para a descontaminação de superfícies consiste na limpeza prévia com água e sabão seguida da desinfecção com solução de álcool 70% (v/v). Na prática assistencial, a aplicação direta de álcool em superfícies contaminadas, sem limpeza prévia, é observada com relativa frequência (GRAZIANO et al., 2013). O grau de hidratação do álcool etílico é um fator importante decisivo na atividade antimicrobiana, decrescendo acentuadamente em concentrações inferiores a 50%, ou superiores a 70% - v/v (REIS et al., 2011; ANDRADE et al., 2007). Como a atividade antimicrobiana dos álcoois está condicionada a sua concentração, em peso ou em volume em relação à água, a concentração de uso deve ser de 70% (v/v) ou 77% (m/v), respectivamente (VENTURELLI et al., 2009). Entretanto, soluções com concentrações inferiores a 70% são usadas por reduzirem os efeitos de ressecamento da pele e apresentarem menor custo (REIS et al., 2011).

Como vantagens da desinfecção com o álcool etílico a 70% (v/v) tem-se a rápida ação bactericida, fúngica e viricida, inclusive sobre bacilos álcool-ácido resistentes (ex. *Mycobacterium tuberculosis*). Adicionalmente, observa-se um efeito irritante leve, ausência de resíduos, baixo custo, facilidade de manuseio e de aquisição, odor relativamente agradável, compatibilidade com sabões e detergentes, estabilidade das soluções e baixa toxicidade ao ambiente. De modo geral, as formulações antissépticas a base de álcoois são hipoalergênicas. Como desvantagens tem-se: ausência de atividade sobre esporos e vírus hidrofílicos, efeito diminuído na presença de

matéria orgânica, evaporação rápida e consequente não ação residual, causa danos a materiais plásticos, de borracha ou acrílico e, por fim, não possui registro como desinfetante na EPA (*Environmental Protection Agency*) (VENTURELLI et al., 2009; PAIVA; MURAI, 2005). Nesse contexto, a partir da associação de soluções de etanol com a NC, formulações foram desenvolvidas buscando obter-se um produto que combinasse a atividade antimicrobiana do etanol e do carvacrol e este capítulo descreve o preparo das soluções etanólicas contendo nanoemulsão de carvacrol (NC).

Apesar dos relatos na literatura que descrevem a ocorrência de sinergismo entre o carvacrol e outros produtos naturais ou antibióticos, a inexistência de trabalhos descrevendo a associação de uma nanoemulsão contendo um antimicrobiano natural ao etanol evidencia o caráter inovador deste trabalho. As soluções etanólicas foram preparadas incorporando-se diferentes concentrações de etanol à nanoemulsão de carvacrol, sendo caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH. Para avaliar a eventual potencialização da atividade antimicrobiana dos compostos de interesse após associação, a CIM das formulações etanólicas estáveis foi determinada. Os resultados descritos neste capítulo serão submetidos para publicação em periódico internacional.

## 1 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.1 Material

Os insumos utilizados para a preparação da nanoemulsão de carvacrol e para a determinação da CIM encontram-se relacionados no Tópico 1.1 (Material) do Capítulo 2. Para a preparação das soluções etanólicas contendo carvacrol nanoemulsionado utilizou-se álcool etílico absoluto (Vetec Química, Brasil).

### 1.2 Métodos

#### 1.2.1 Preparação das soluções etanólicas contendo nanoemulsão de carvacrol (NC)

Para o preparo das soluções etanólicas contendo nanoemulsão de carvacrol (NC), primeiramente, procedeu-se o preparo da nanoemulsão 1% (m/v) de carvacrol, pela técnica de emulsificação espontânea livre de solvente orgânico, conforme descrito no Tópico 1.2.1.2 do Capítulo

2. Na sequência, a solução etanólica de partida (etanol 70%) foi preparada à temperatura de 20°C, seguindo as orientações da Farmacopéia Brasileira Homeopática (BRASIL, 2010a). Conforme a Farmacopéia Brasileira Homeopática (BRASIL, 2010a), para o preparo de soluções etanólicas é facultado adotar tanto o critério volumétrico (v/v - volume do etanol por volume de água), quanto o critério ponderal (p/p - peso do etanol por peso de água). Como o instrumento utilizado para determinar o grau alcoólico (i.e., densímetro ou alcoômetro centesimal) somente expressa a concentração do etanol em volume, neste estudo adotou-se o critério volumétrico (% v/v).

Por fim, para obtenção de soluções etanólicas contendo nanoemulsão de carvacrol com teores crescentes de etanol (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% e 70%) (Tabela 11), diferentes volumes de solução etanólica (etanol 70%) foram adicionados à NC e homogeneizados. O teor alcóolico foi verificado com auxílio do alcoômetro centesimal e ajustado, se necessário, pela adição de nanoemulsão de carvacrol ou etanol 70%, conforme descrito na Farmacopéia Brasileira Homeopática (BRASIL, 2010a).

Tabela 11 - Identificação e composição das formulações resultantes da associação da solução etanólica à nanoemulsão de carvacrol.

<b>Formulações</b>	<b>Volume de etanol 70% (mL)</b>	<b>Volume de nanoemulsão de carvacrol (mL)</b>
Sol. Et. 10% + NC	16,5	83,5
Sol. Et. 20% + NC	32	68
Sol. Et. 30% + NC	47	53
Sol. Et. 40% + NC	62	38
Sol. Et. 50% + NC	75	25
Sol. Et. 60% + NC	88	12
Sol. Et. 70% + NC	*	23

Legenda: Sol. Et. 10% + NC = 10% de etanol + nanoemulsão de carvacrol; Sol. Et. 20% + NC = 20% de etanol + nanoemulsão de carvacrol; Sol. Et. 30% + NC = 30% de etanol + nanoemulsão de carvacrol; Sol. Et. 40% + NC = 40% de etanol + nanoemulsão de carvacrol; Sol. Et. 50% + NC = 50% de etanol + nanoemulsão de carvacrol; Sol. Et. 60% + NC = 60% de etanol + nanoemulsão de carvacrol; Sol. Et. 70% + NC = 70% de etanol + nanoemulsão de carvacrol; \*Utilizado 77 mL de etanol absoluto.

### 1.2.2 Caracterização das formulações

As soluções etanólicas contendo carvacrol nanoemulsionado foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH, conforme metodologias previamente descritas no Tópico 1.2.2 (Caracterização das nanoemulsões de carvacrol) do Capítulo 2. Para fins de comparação, os parâmetros físico-químicos da nanoemulsão de carvacrol sem adição de qualquer teor de etanol (NC<sub>0</sub>), também foram determinados.

### 1.2.3 Avaliação da estabilidade das formulações

As formulações em estudo tiveram os parâmetros tamanho de gotícula, PDI, potencial zeta e pH monitorados durante 120 dias de armazenamento, à temperatura ambiente. Para fins de comparação, a estabilidade da nanoemulsão de carvacrol sem a adição de etanol também foi avaliada.

### 1.2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

A atividade antimicrobiana das soluções etanólicas contendo carvacrol nanoemulsionado foi realizada pela determinação da CIM, utilizando-se o método de microdiluição em caldo, descrito no documento M7-A7 do CLSI (CLSI, 2006), de acordo com o descrito no Tópico do 1.2.5 (Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*) do Capítulo 2. Na determinação da CIM, a concentração inicial de ativo testada contra o *S. aureus* foi de 500 µg/mL, procedendo-se a diluição seriada até a concentração de 3,90 µg/mL. Nos experimentos com as cepas de *S. typhimurium* e de *P. aeruginosa* a amplitude de concentrações investigadas variou de 2000 a 15,62 µg/mL.

## 1.3 Análise Estatística

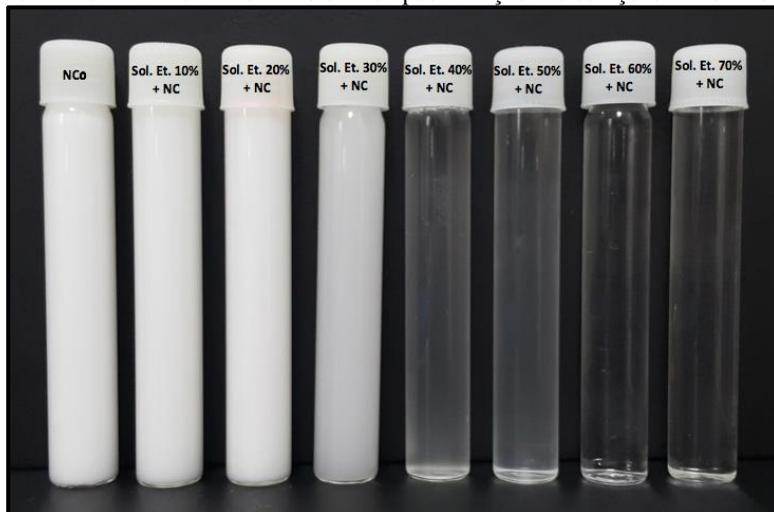
Os dados foram coletados, sumarizados e submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, dependendo do ensaio, seguida pelos pós testes de *t-Student*, *Tukey* ou Bonferroni, quando adequado, com suporte do programa estatístico *GraphPad Prism*<sup>®</sup> 5 (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA, USA). Todos os resultados foram considerados significativos para  $p < 0,05$ , sendo apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP).

## 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1 Caracterização das soluções etanólicas contendo nanoemulsão de carvacrol

A nanoemulsão de carvacrol sem etanol apresentou aspecto leitoso homogêneo e coloração branca, sendo constatada alteração de cor nas formulações com teores de etanol  $\geq$  a 30% (Figura 19).

Figura 19 - Detalhe do aspecto visual do padrão de cor das formulações contendo carvacrol nanoemulsionado após a adição das soluções etanólicas.



Legenda:  $NC_0$  = Nanoemulsão de Carvacrol sem etanol; Sol. Et. 10% + NC = 10% de etanol + nanoemulsão de carvacrol; Sol. Et. 20% + NC = 20% de etanol + nanoemulsão de carvacrol; Sol. Et. 30% + NC = 30% de etanol + nanoemulsão de carvacrol; Sol. Et. 40% + NC = 40% de etanol + nanoemulsão de carvacrol; Sol. Et. 50% + NC = 50% de etanol + nanoemulsão de carvacrol; Sol. Et. 60% + NC = 60% de etanol + nanoemulsão de carvacrol; Sol. Et. 70% + NC = 70% de etanol + nanoemulsão de carvacrol. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

A perda do aspecto leitoso pode ser resultado da destruturação do sistema coloidal, provavelmente pela solubilização da lecitina em soluções de etanol com concentrações iguais ou superiores a 30%. As formulações que apresentaram alteração visual no aspecto não foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, PDI e PZ.

As características físico-químicas das soluções etanólicas contendo carvacrol nanoemulsionado e da nanoemulsão de carvacrol sem etanol (NC<sub>0</sub>) são apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Caracterização físico-química das soluções etanólicas contendo nanoemulsão de carvacrol quanto ao tamanho de partícula, índice de polispersão (PDI) e potencial zeta (PZ). Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas distintas em uma mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA única via seguida do teste de Tukey, p < 0,05).

Formulações	Tamanho de médio de partícula (nm)	PDI	PZ (mV)
NC <sub>0</sub>	314,57 <sup>a</sup> $\pm$ 10,07	0,160 <sup>a</sup> $\pm$ 0,020	-44,70 <sup>a</sup> $\pm$ 4,91
Sol. Et. 10% + NC	312,70 <sup>a</sup> $\pm$ 12,56	0,225 <sup>b</sup> $\pm$ 0,034	-49,00 <sup>a</sup> $\pm$ 1,22
Sol. Et. 20% + NC	276,87 <sup>b</sup> $\pm$ 3,81	0,197 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,019	-42,80 <sup>a</sup> $\pm$ 0,62

Legenda: NC<sub>0</sub> = Nanoemulsão de Carvacrol sem etanol; Sol. Et. 10% + NC = 10% de etanol + nanoemulsão de carvacrol; Sol. Et. 20% + NC = 20% de etanol + nanoemulsão de carvacrol.

Não foram observadas diferenças estatísticas significativa (p < 0,05) entre os valores médios de tamanho de partícula da nanoemulsão de carvacrol sem etanol e da solução etanólica 10% (Sol. Et. 10% + NC), indicando a ausência do efeito do etanol sobre o sistema de origem nesta concentração de álcool. De modo contrário, a adição de 20% de etanol causou redução significativa no tamanho de partícula, comparativamente à NC<sub>0</sub> (Tabela 12). Provavelmente, o etanol a 20% atuou como um co-surfactante, reduzindo a tensão interfacial entre as fases oleosa e aquosa e, por consequência, determinando a redução no tamanho de partícula NIRMALA; NAGARAJAN, 2017). Apesar da incorporação de etanol ter elevado significativamente (p < 0,05) o PDI da formulação Sol. Et. 10% + NC, comparativamente à NC<sub>0</sub> (Tabela 12), diversos autores (GALINDO-PÉREZ et al., 2018; BARANAUSKAITE et al., 2018; KABRI et al., 2011; ALMEIDA et al., 2009; ALVES et al., 2007) reportam que os valores de PDI inferiores a 0,25 indicam uma estreita distribuição no tamanho das partículas, conferindo homogeneidade ao sistema nanoestruturado. Comparativamente ao valor do PZ da NC<sub>0</sub>, o PZ das soluções etanólicas (Sol. Et. 10% + NC e Sol. Et. 20% + NC) não foi influenciado (p < 0,05) pela incorporação de etanol ao sistema (Tabela 12).

Frente a adequação das características físico-químicas, conforme literatura, as preparações coloidais Sol. Et. 10% + NC e a Sol. Et. 20% + NC foram submetidas ao estudo de estabilidade.

## 2.2 Avaliação da estabilidade

As formulações Sol. Et. 10% + NC e da Sol. Et. 20% + NC não apresentaram alterações na cor e/ou aspecto durante o estudo (Figura 20).

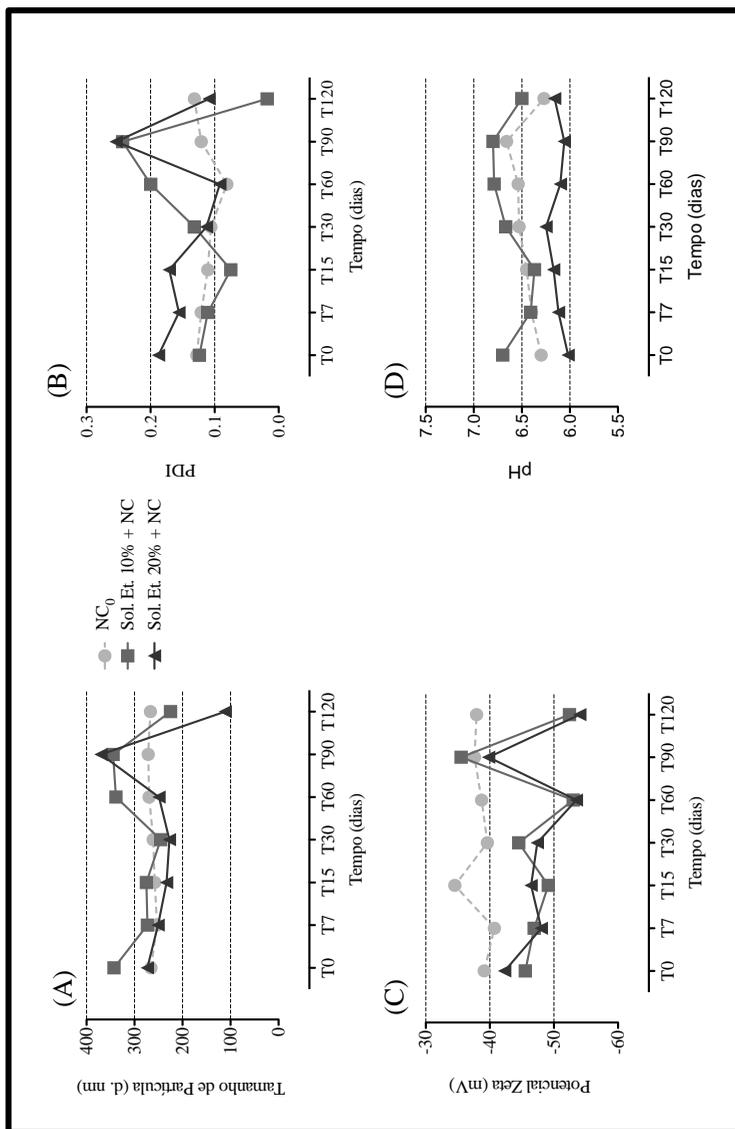
Figura 20 - Detalhes das colorações das soluções etanólicas contendo nanoemulsão de carvacrol, após 120 de estocagem à 25°C.



Legenda: NC<sub>0</sub> = Nanoemulsão de Carvacrol sem etanol; Sol. Et. 10% + NC = 10% de etanol + nanoemulsão de carvacrol; Sol. Et. 20% + NC = 20% de etanol + nanoemulsão de carvacrol. Fonte: Elaborado pela autora (2019).

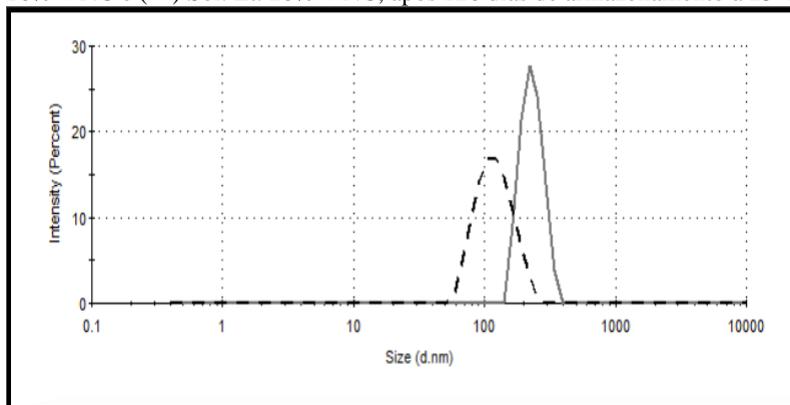
Ao longo de 120 dias de armazenamento à 25°C foram monitoradas as propriedades físico-químicas das formulações Sol. Et. 10% + NC e Sol. Et. 20% + NC, conforme apresentado na Figura 21. Para fins de comparação, os parâmetros físico-químicos da nanoemulsão de carvacrol desprovida de etanol foram monitorados.

Figura 21 - Propriedades físico-químicas das formulações Et. 10% + NC e Et. 20% + NC, armazenadas à temperatura ambiente por um período de 120 dias. (A) tamanho de partícula; (B) índice de polidispersão - PDI; (C) potencial zeta e (D) pH.



A análise por espalhamento de luz dinâmico das formulações etanólicas, comparativamente à NC<sub>0</sub>, mostrou que o tamanho de partícula e o PDI até o 30<sup>o</sup> dia não foram influenciados pela incorporação de etanol ao sistema coloidal. Entretanto, no 90<sup>o</sup> dia de estocagem os parâmetros tamanho de partícula, PDI e PZ das formulações Sol. Et. 10% + NC e Sol. Et. 20% + NC apresentaram elevação brusca para, na sequência, decaírem (Figura 21). Este comportamento pode ser atribuído ao constante movimento e a coalescência momentânea das nanopartículas da suspensão coloidal, no instante da análise. Os constantes movimentos Brownianos, responsáveis por evitar fenômenos de instabilidade (floculação, a sedimentação ou creameação) em sistemas coloidais, resultam do reduzido tamanho das partículas (entre 1 a 600 nm), permitindo que a mistura não sofra os efeitos gravitacionais (BAJERSKI et al., 2016; CODEVILLA et al., 2015; LOVELYN, ATTAMA, 2011; MANSUR et al., 2007; TADROS et al., 2004; SCHAFFAZICK et al., 2003). Apesar da pontual elevação dos valores de PDI no 90<sup>o</sup> dia, segundo a literatura (GALINDO-PÉREZ et al., 2018; BARANAUSKAITE et al., 2018; KHATIBI, et al., 2015; LOVELYN; ATTAMA, 2011; KABRI et al., 2011; ALMEIDA et al., 2009; ALVES et al., 2007), os valores de PDI das soluções etanólicas (inferiores a 0,3) indicam baixo grau de heterogeneidade no tamanho das partículas, conferindo perfil monodisperso às formulações durante o estudo de estabilidade, i.e., 120 dias (Figura 22).

Figura 22 - Distribuição do tamanho de partícula das formulações (—) Sol. Et. 10% + NC e (---) Sol. Et. 20% + NC, após 120 dias de armazenamento à 25°C.



O PZ da Sol. Et. 10% + NC e da Sol. Et. 20% + NC mesmo na presença de etanol permaneceu negativo, provavelmente devido à presença de lecitina nas formulações. Para estas formulações os valores, em módulo, do PZ podem ser considerados elevados, contribuindo à estabilidade das formulações (Figura 21) devido à repulsão eletrostática superficial das nanopartículas (SYED; SARKAR, 2018; GALINDO-PÉREZ et al., 2018). O valor de pH das soluções etanólicas foi semelhante ao da NC<sub>0</sub> (Figura 21). Assim, pode-se afirmar que o contato das nanopartículas com o etanol em concentrações de até 20% não foi determinante à desestruturação do sistema nanoemulsionado, mesmo por longo período de tempo (i.e., 120 dias).

### 2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

Conforme já referenciado anteriormente, a concentração inibitória mínima (CIM) é aquela que causa um percentual de inibição de crescimento microbiano igual ou superior a 90%. Os resultados da CIM do crescimento microbiano da nanoemulsão de carvacrol (NC) e das formulações Et. 10% + NC e Sol. Et. 20% + NC, frente as cepas ATTC de *S. aureus*, *S. typhimurium* e de *P. aeruginosa*, são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Concentração inibitória mínima (CIM) da nanoemulsão de carvacrol (NC) e das formulações Sol. Et. 10% + NC e Sol. Et. 20% + NC determinada pelo método de microdiluição em caldo.

Tratamento	CIM (µg/mL)		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>
NC	125	250	500
Sol. Et. 10% + NC	125	250	500
Sol. Et. 20% + NC	125	250	500

Legenda: NC = Nanoemulsão de Carvacrol sem etanol; Sol. Et. 10% + NC = 10% de etanol + nanoemulsão de carvacrol; Sol. Et. 20% + NC = 20% de etanol + nanoemulsão de carvacrol.

Os resultados dos controles de 100% de crescimento microbiano, realizados conforme descrito no Tópico 1.2.5.1.2 (Método de microdiluição em caldo) do Capítulo 2, indicaram que os veículos (soluções etanólicas 10% ou 20% contendo nanoemulsão branca) não apresentaram atividade antimicrobiana frente as cepas testadas (dados não apresentados).

A capacidade do carvacrol de exercer efeitos sinérgicos em

combinação com antibióticos sintéticos ou com outros fitocompostos já foi relatada. A atividade antimicrobiana do carvacrol combinado com ácido nalidíxico foi investigada utilizando-se oito espécies bacterianas resistentes a aquele ácido (*Escherichia coli*, *E. coli* 078, *Salmonella typhimurium*, *S. derby*, *S. enteritidis*, *S. minnesota*, *Klebsiella oxytoca* e *Enterobacter cloacae*) foi investigada por Choi e colaboradores (2009), usando o método de diluição em caldo e confirmada pelo método de difusão de disco. A CIM do carvacrol livre variou de 125 a 500 µg/mL e após combinação com o ácido nalidíxico variou de 31,25 a 250 µg/mL. Magi, Marini e Facinelli (2015) demonstraram o efeito sinérgico da associação do carvacrol a da eritromicina contra 21 (65,6%) das 32 cepas de *Streptococcus pyogenes* - Grupo A, isoladas de crianças com faringoamigdalite na Itália.

A avaliação de efeitos antibacterianos combinados de eugenol, cinamaldeído, timol e carvacrol contra *E. coli* foi realizada por Pei et al. (2009). Ensaio de microdiluição em caldo indicaram que a CIM do carvacrol foi de 400 mg/L. Efeitos sinérgicos foram detectados combinando carvacrol com eugenol, ou carvacrol com timol. Para essas associações a CIM diminuiu para 100 mg/L. Syad e Sarkar (2018), observaram que a associação de geraniol e carvacrol (1:1) demonstrou um valor de CIM (200 µL/mL) inferior ao observado com ao geraniol (1200 µL/mL) e do carvacrol (400 µL/mL) livres, contra *E. coli* (MTCC 443) e o *Bacillus cereus* (MTCC 430). A emulsão formulada a partir da associação dos dois ativos também demonstrou um valor da CIM menor (150 µL/mL), tanto para *E. coli* como para o *B. cereus*, comparativamente às formulações preparadas com o geraniol e o carvacrol isoladamente.

Os resultados da CIM (Tabela 13), determinada pelo método de microdiluição em caldo, indicam que as cepas apresentaram mesmo perfil de susceptibilidade às formulações etanólicas em relação a NC (Tópico: 2.6.2 - Determinação da concentração inibitória mínima/CIM do Capítulo 2). A associação com 10% ou 20% de etanol não foi capaz de aumentar a atividade antimicrobiana do caracol nanoemulsionado frente às cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028). Este fato pode estar relacionado a evaporação do etanol durante à etapa de incubação ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) utilizada na técnica microdiluição em caldo ou à baixa concentração de álcool incorporada ao sistema coloidal, insuficiente para promover um aumento na atividade antimicrobiana. Para todos os tratamentos, a CIM das cepas bacterianas foi confirmada pela oxirredução da

resazurina. Devido a ausência de comprovação de efeito sinérgico entre a associação da NC e etanol, estas formulações não foram utilizadas nos ensaios de avaliação do potencial desinfetante/antisséptico.

## **CAPÍTULO 4: GÉIS CONTENDO CARVACROL NANOEMULSIONADO**

---



Pode-se definir gel como uma preparação semissólida composta de partículas coloidais que não sedimentam, permanecendo dispersas. Nesta preparação, as substâncias formadoras de gel são os polímeros, que quando dispersos em meio aquoso, são incrementadores de viscosidade (VILLANOVA, ORÉFICE, CUNHA, 2010; CORRÊA et al., 2005). Muitos polímeros podem ser empregados na obtenção de géis, mas a maioria é de natureza hidrofílica, a exemplo do Carbopol<sup>®</sup>. As características hidrofóbicas próprias do carvacrol limitam as possibilidades de incorporação deste ativo em polímeros com características hidrofílicas (NUNES et al., 2012). Segundo o fabricante, o polímero Aristoflex<sup>®</sup> AVC (*Clariant International Ltd.*) permite a obtenção de géis a partir de ativos oleosos sem a necessidade de uso de agente emulsificante, por reter e estabilizar as gotículas de óleo (líquidas ou sólidas) em uma estrutura reticulada, resultando em formulações do tipo óleo/água (O/A), conhecidas como pseudo-emulsões (CLARIANT, 2013). O Aristoflex<sup>®</sup> AVC é um polímero sintético que corresponde a um copolímero do ácido sulfônico acrilóildimetiltaurato e vinilpirrolidona neutralizado. Já foi dermatologicamente testado, não apresentando efeito irritante à pele (KOVALIOVA; POLOVKO, 2016; PHARMASPECIAL, s/d).

Uma das grandes vantagens do uso das nanoemulsões como sistemas carreadores é que são passíveis de incorporação em diversas apresentações, como espumas, cremes, géis, líquidos e sprays (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; SHAH; BHALODIA; SHELAT, 2010). Frente ao exposto, géis foram desenvolvidos a partir da base dermocosmética de preparação instantânea Aristoflex<sup>®</sup> AVC, após incorporação de carvacrol livre ou nanoemulsionado, com e sem adição de etanol, em diferentes concentrações. A inexistência de trabalhos que relatam a incorporação de uma nanoemulsão de carvacrol a polímeros formadores de gel evidencia o caráter inovador deste trabalho. Sendo assim, este capítulo descreve os materiais e métodos empregados no desenvolvimento, caracterização da densidade relativa e da viscosidade, monitoramento da estabilidade de formulações semissólidas contendo NC. Para fins de comparação, géis de diferentes teores alcóolicos contendo ou não ativo livre e NC foram desenvolvidos.

A viscosidade de um fluido traduz a sua resistência ao fluxo ou movimento, sendo que quanto maior a viscosidade maior a resistência (CORRÊA et al., 2005) e menor a velocidade com que o fluido se movimenta (LAHOUD; CAMPOS, 2010). A viscosidade é dependente das características físico-químicas e das condições de temperatura imposta ao material (BRASIL, 2008). Pode ser determinada em

viscosímetro rotativo coaxial e consiste na medição do torque requerido para rodar o sensor imerso na amostra a diferentes velocidades de rotação impostas ao eixo metálico. Assim, podem ser traçadas curvas de viscosidade correspondentes a velocidade, afim de classificar os sistemas em Newtonianos ou não Newtonianos, isto é, que apresentam ou não viscosidade constante sob determinadas condições (ISAAC et al., 2008).

O estudo da estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais ao qual ele é submetido desde a fabricação até o término do prazo de validade (BRASIL, 2008). O teste de prateleira consiste em armazenar a amostra à temperatura ambiente em embalagem apropriada, analisando-a periodicamente quanto ao aspecto, cor, odor e pH até o término do prazo de validade (ISAAC et al., 2008). Já o monitoramento das propriedades organolépticas constitui o indicativo mais acessível para se avaliar a qualidade de uma preparação semissólida e para detectar alterações. O simples exame visual pode ser indicativo da homogeneidade da preparação. A não ocorrência de separação de fases, precipitação e/ou turvação, após monitoramento periódico, é indicativo de estabilidade da amostra ensaiada (ISAAC et al., 2008; NOGUEIRA-PRISTA; ALVES; MORGADO, 2008). A observação da cor e do aroma característicos são indicadores relevantes para avaliar o estado de conservação da preparação, uma vez que alterações naquelas variáveis sugerem processo de degradação da formulação (NOGUEIRA-PRISTA; ALVES; MORGADO, 2008). A modificação do odor característico pode sugerir a presença de contaminante microbiano (ISAAC et al., 2008).

Este capítulo também apresenta os resultados dos estudos *in vitro* de avaliação da atividade antimicrobiana do gel de nanoemulsão de carvacrol (GNC). Os resultados descritos neste capítulo serão submetidos para publicação em periódico internacional.

## 1 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.1 Material

Os insumos utilizados no desenvolvimento da nanoemulsão de carvacrol e para a determinação da CIM encontram-se relacionados no Tópico 1.1 - Materiais do Capítulo 2. Os reagentes empregados no desenvolvimento das formulações etanólicas estão descritos no Tópico 1.1 - Materiais do Capítulo 3. Para o desenvolvimento dos géis

utilizou-se o copolímero Aristoflex<sup>®</sup> AVC (*Clariant International Ltd.*, EUA). <https://www.lojasynth.com/tech-vision> Para avaliação da antimicrobiana pelo ensaio de disco difusão foi utilizado meio de cultivo bacteriano Ágar Müeller Hinton - MH (KASVI), placa de Petri 90 x 15mm (KASVI), *swab* de algodão estéril (ABSORVE), discos para antimicrobiana (Sensibiodisc/CECON) e paquímetro universal (Digimess).

## 1.2 Métodos

### 1.2.1 Preparação de géis contendo nanoemulsão de carvacrol

Para a preparação do gel contendo carvacrol nanoemulsionado, 0,5% (m/v) do copolímero Aristoflex<sup>®</sup> AVC (*Clariant International Ltd.*, EUA) foi incorporado à NC e às soluções etanólicas contendo NC (Sol. Et. 10% + NC; Sol. Et. 20% + NC), sob agitação (400 rpm, agitador Heidolph RZR) por 20 min, ou até completa gelificação. A NC, a Sol. Et. 10% + NC e a Sol. Et. 20% + NC foram previamente desenvolvidas, conforme Tópico 1.2.1.2 (Técnica de emulsificação espontânea livre de solvente - auto-nanoemulsificação) do Capítulo 2 e Tópico 1.2.1 (Preparação das soluções etanólicas contendo nanoemulsão de carvacrol - NC) do Capítulo 3, respectivamente. Para fins de comparação, géis sem carvacrol (gel base) e com carvacrol livre, com e sem etanol, foram preparados. A composição dos géis preparados encontra-se descrita no Quadro 3.

Quadro 3 - Identificação e composição dos géis desenvolvidos após a incorporação do copolímero Aristoflex<sup>®</sup> AVC.

Identificação da Formulação	Aristoflex® AVC (m/v)	Nanoemulsão de carvacrol (v/v)	Carvacrol (m/v)	Etanol 70%	Água (q.s.p)
GB		-	-	-	100 mL
GC		-	1%	-	99 mL
GNC		100 mL	-	-	-
G-Sol. Et. 10% + NC		83,50 mL	-	16,50 mL	-
G-Sol. Et. 20% + NC		68 mL	-	32 mL	-
AG70%	0,5%	-	-	100 mL	-
AG10% + 1% ativo		-	1%	16,50 mL	83,50 mL
AG20% + 1% ativo		-	1%	32 mL	68 mL
AG30% + 1% ativo		-	1%	47,30 mL	52,70 mL
AG40% + 1% ativo		-	1%	61,80 mL	38,20 mL
AG50% + 1% ativo		-	1%	75,30 mL	24,70 mL
AG60% + 1% ativo		-	1%	88,30 mL	11,70 mL
AG70% + 1% ativo		-	1%	100 mL	-

Legenda: GB = Gel Base; GC = Gel de Carvacrol; GNC = Gel de Nanoemulsão de Carvacrol; G-Sol. Et. 10% + NC = Gel de Solução Etanólica 10% + Nanoemulsão de Carvacrol; G-Sol. Et. 20% + NC = Gel de Solução Etanólica 20% + Nanoemulsão de Carvacrol; AG70% = Álcool Gel 70%; AG10% + 1% ativo = Álcool Gel 10% + 1% ativo; AG20% + 1% ativo = Álcool Gel 20% + 1% ativo; AG30% + 1% ativo = Álcool Gel 30% + 1% ativo; AG40% + 1% ativo = Álcool Gel 40% + 1% ativo; AG50% + 1% ativo = Álcool Gel 50% + 1% ativo; AG60% + 1% ativo = Álcool Gel 60% + 1% ativo; AG70% + 1% ativo = Álcool Gel 70% + 1% ativo.

## 1.2.2 Caracterização das formulações semissólidas

### 1.2.2.1 Determinação da densidade

A densidade dos géis foi mensurada conforme as determinações do Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2008), utilizando um picnômetro de alumínio específico para formulações semissólidas. Primeiramente, o picnômetro foi completamente preenchido com água destilada e a massa determinada em balança analítica. Após, o picnômetro foi preenchido com os géis desenvolvidos até extravasamento da formulação, o excesso foi removido e a massa determinada. A densidade foi calculada a partir da Equação 4 (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2008). As determinações foram realizadas em triplicata.

$$d_{\text{gel}/\text{água}} = \frac{m_{\text{gel}}}{m_{\text{água}}} \quad (4)$$

Onde:

$m_{\text{gel}}$  = massa de gel que ocupa o volume do picnômetro;

$m_{\text{água}}$  = massa de água que ocupa o mesmo volume.

### 1.2.2.2 Determinação da viscosidade

A viscosidade dos géis foi determinada em viscosímetro rotacional Brookfield (modelo DV-II+, série LV, *Brookfield Engineering Laboratories, Inc.*), equipado com *spindle* LV-4 (64), acoplado a um banho de água circulante termostatizado. A velocidade de rotação do *spindle* variou de 10 até 100 rpm e os ensaios foram realizados à 25°C. As determinações foram realizadas em triplicata para cada velocidade de rotação imposta ao gel e o resultado da viscosidade foi expresso em unidade de cP (*centiPoise*).

## 1.2.3 Avaliação da estabilidade das formulações semissólidas

Os géis contendo nanoemulsão de carvacrol foram armazenados durante 60 dias em embalagens plásticas de parede dupla, à temperatura

ambiente (25°C). Em tempos pré-determinados, a medição do pH em potenciômetro digital de bancada (Quimis<sup>®</sup>) na formulação sem diluição prévia foi efetuada. As características cor, odor e aspecto visual foram determinadas no início e ao final do período de estocagem, comparando-se as formulações. No monitoramento do aspecto visual das formulações, considerou-se a ocorrência de fenômenos de instabilidade, como separação de fases, precipitação e/ou turvação. As alterações foram classificadas como homogêneas ou heterogêneas.

#### 1.2.4 Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* pelo método de difusão em ágar pela técnica de poços

A determinação da atividade antimicrobiana das formulações semissólidas GC e GNC adotou o método de difusão em ágar da Norma M2-A9, do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006), com modificações. Neste caso, ao invés de utilizar discos de papel impregnados com as amostras, foram confeccionados poços nas matrizes geleificadas para aplicação das concentrações das formulações semissólidas.

As cepas bacterianas utilizadas neste ensaio de atividade antimicrobiana, *in vitro* estão descritas no Tópico 1.2.5.1.1 – Os Isolados do Capítulo 2. Os inóculos bacterianos ( $1,0 \times 10^8$  a  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL) foram preparados em salina estéril (0,9% NaCl, m/v). A concentração do inóculo foi determinada em espectrofotômetro ( $\lambda = 625$  nm) e o resultado da absorbância ajustado para o intervalo de 0,08 a 0,10 (equivalente a 0,5 unidades da escala de MacFarland) (CLSI, 2006).

Seguindo a metodologia proposta pela Norma M2-A9 (CLSI, 2006), foram utilizadas placas de Petri de 90 mm de diâmetro, aplicando-se uma camada de ágar Mueller-Hinton (MH) aplicada na placa foi de  $4,0 \pm 0,5$  mm de espessura. Com o auxílio de *swab* de algodão estéril, as suspensões bacterianas foram inoculadas na superfície do ágar MH, em três direções, para obtenção de um crescimento confluyente e homogêneo. Após 5 min, orifícios de 6 mm de diâmetro interno foram abertos no ágar, utilizando-se um perfurador de vidro previamente esterilizado. Nestes, foram adicionados 75  $\mu$ L de GC e GNC contendo ativo nas concentrações 0,25, 0,5, 0,75 e 1% (m/v). Para fins comparativos o hipoclorito de sódio comercial nas mesmas concentrações dos tratamentos e álcool gel 70% (m/v) também foram testados. Após 24, 48 e 72h de incubação à 36 °C, os diâmetros dos

halos de inibição (HI) de crescimento microbiano foram medidos, com auxílio de um paquímetro. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Gel base foi utilizado como controle negativo (ausência de inibição do crescimento microbiano na superfície do ágar). A sensibilidade das cepas ATCC de *S. aureus*, de *S. typhimurium* e de *P. aeruginosa* foi avaliada segundo o método de difusão em ágar da Norma M2-A9 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006). Os antibióticos clindamicina 2 µg, eritromicina 15 µg e gentamicina 10µg foram testados para *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Discos de ciprofloxacina 5 µg e ampicilina 10 µg foram testados contra *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e discos de gentamicina 10 µg e ciprofloxacina 5 µg contra *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). Consoante ao diâmetro dos halos de inibição formados pelos antibióticos, as cepas bacterianas foram classificadas conforme sua resistência ou sensibilidade, segundo os critérios definidos pela norma M100-S16 do CLSI (CLSI, 2006).

### 1.3 Análise Estatística

Os dados foram coletados, sumarizados e submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, dependendo do ensaio, seguida pelos pós-testes de *t-student*, Tukey ou Bonferroni quando adequado, usando o *software GraphPad Prism*<sup>®</sup> 5 (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA, USA). Todos os resultados foram considerados significativos para  $p < 0,05$ , sendo apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP).

## 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

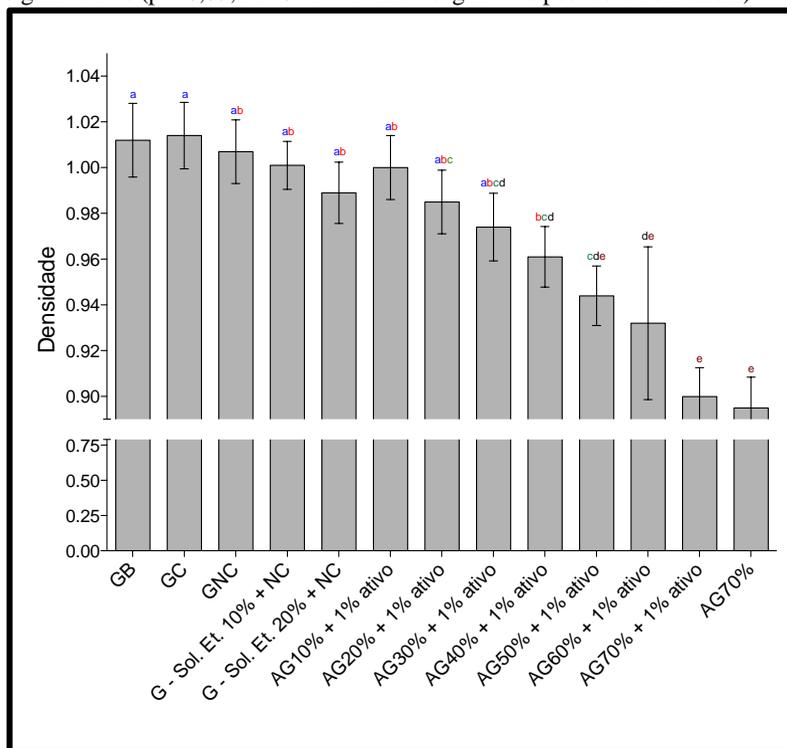
### 2.1 Caracterização das formulações semissólidas

O gel contendo nanoemulsão de carvacrol foi preparado com sucesso e a formulação apresentou aspecto brilhoso, coloração branca e odor característico do carvacrol. Sua consistência mostrou-se adequada, apresentando característica não oleosa. Os demais géis contendo carvacrol livre, adicionado ou não de etanol, também foram preparados com sucesso.

### 2.1.1 Determinação da densidade

A densidade relativa é a relação entre a densidade absoluta da amostra e a densidade absoluta de uma substância usada como padrão. Neste estudo, a água foi a substância padrão utilizada para o cálculo da densidade relativa (BRASIL, 2008). Os valores de densidade dos géis são apresentados na Figura 23.

Figura 23 - Densidade relativa dos géis à 25°C. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). As letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ; ANOVA via única seguida do pós-teste Bonferroni).



Legenda: GB = Gel Base; GC = Gel de Carvacrol; GNC = Gel de Nanoemulsão de Carvacrol; G-Sol. Et. 10% + NC = Gel de Solução Etanólica 10% + Nanoemulsão de Carvacrol; G-Sol. Et. 20% + NC = Gel de Solução Etanólica 20% + Nanoemulsão de Carvacrol; AG70% = Álcool Gel 70%; AG10% + 1% ativo = Álcool Gel 10% + 1% ativo; AG20% + 1% ativo = Álcool Gel 20% + 1% ativo; AG30% + 1% ativo = Álcool Gel 30% + 1% ativo; AG40% + 1% ativo = Álcool Gel 40% + 1% ativo; AG50% + 1% ativo = Álcool Gel 50% + 1% ativo; AG60% + 1% ativo = Álcool Gel 60% + 1% ativo; AG70% + 1% ativo = Álcool Gel 70% + 1% ativo.

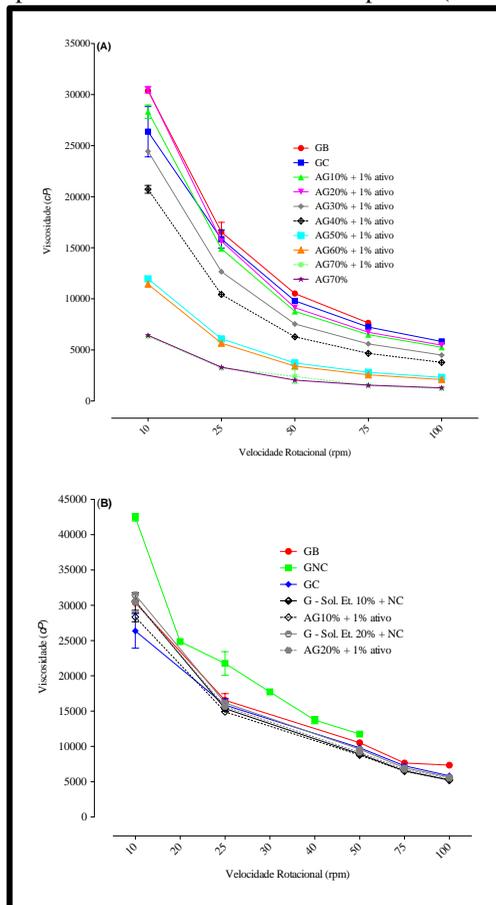
A formulação GC apresentou densidade relativa de 1,014, enquanto que, o AG70% + 1% ativo apresentou densidade igual a 0,900. Comparando-se a densidade relativa determinada para o GB (1,012) e para o AG 70% (0,895) também foi observada a redução significativa ( $p < 0,05$ ) dos valores obtidos (Figura 23). Os resultados revelaram que a densidade relativa dos géis alcóolicos é inversamente proporcional à quantidade de etanol acrescida à formulação. Durante o preparo dos géis, o polímero Aristoflex<sup>®</sup> AVC é hidratado pela fase aquosa (KOVALIOVA; POLOVKO, 2016; CLARIANT, 2013; PHARMASPECIAL, s/d.). Nos géis alcóolicos ocorre a redução gradativa da fase aquosa, sendo esta proporcionalmente substituída pelo etanol. Nos géis com maior concentração de etanol, o grau de hidratação do polímero é influenciado o que altera a massa da formulação desenvolvida e, por consequência, a densidade.

Cordeiro e colaboradores (2013), em estudo da estabilidade de géis dermatológicos de Carbopol<sup>®</sup> e Natrosol<sup>®</sup> contendo óleo essencial de gengibre, detectaram valores de densidades de 1,05 g/mL e 1,06 g/mL, respectivamente, após ciclos de congelamento-descongelamento (estresse térmico), valores próximos aos observados neste trabalho.

### 2.1.2 Determinação da viscosidade

Os dados de viscosidade dos géis desenvolvidos são apresentados na Figura 24.

Figura 24 - Curvas de viscosidade dos géis desenvolvidos: **(A)** géis de carvacrol livre, com ou sem adição de etanol e **(B)** géis de carvacrol livre e os géis de nanoemulsão de carvacrol contendo mesmos teores de etanol. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ).



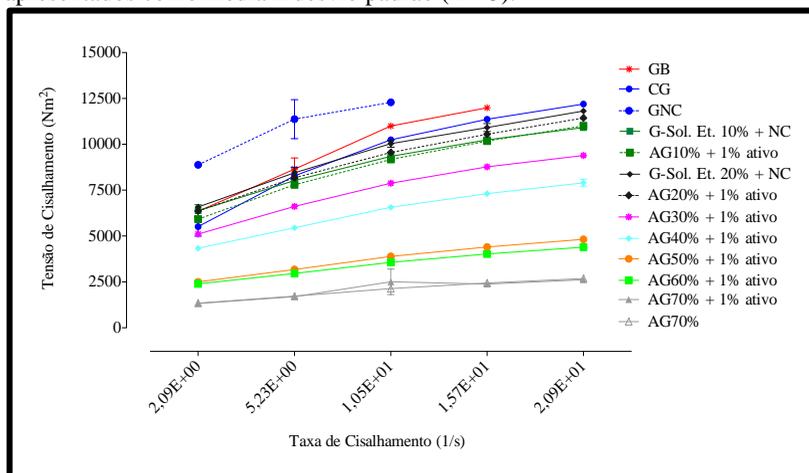
Legenda: GB = Gel Base; GC = Gel de Carvacrol; GNC = Gel de Nanoemulsão de Carvacrol; G-Sol. Et. 10% + NC = Gel de Solução Etanólica 10% + Nanoemulsão de Carvacrol; G-Sol. Et. 20% + NC = Gel de Solução Etanólica 20% + Nanoemulsão de Carvacrol; AG70% = Álcool Gel 70%; AG10% + 1% ativo = Álcool Gel 10% + 1% ativo; AG20% + 1% ativo = Álcool Gel 20% + 1% ativo; AG30% + 1% ativo = Álcool Gel 30% + 1% ativo; AG40% + 1% ativo = Álcool Gel 40% + 1% ativo; AG50% + 1% ativo = Álcool Gel 50% + 1% ativo; AG60% + 1% ativo = Álcool Gel 60% + 1% ativo; AG70% + 1% ativo = Álcool Gel 70% + 1% ativo.

Os resultados demonstraram que todas as formulações apresentaram fluxo característico de sistemas não Newtonianos, devido à variação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento (Figura 24 - A e B). Nos fluidos não Newtonianos a viscosidade também é denominada de viscosidade aparente (FAUSTINO, et al., 2016), sendo que estes fluidos não obedecem à lei da equação de fluxo proposta por Newton. Nos fluidos não Newtonianos a viscosidade depende de vários fatores, e.g., estrutura das substâncias, forma de preparo do sistema e tempo de repouso, os quais definem o quociente entre a tensão e a velocidade de cisalhamento como não constante (LAHOUD; CAMPOS, 2010).

Comparando-se os perfis de viscosidade das formulações de GB *versus* GC e AG70% *versus* AG70% + 1% ativo, conclui-se que a adição de 1% de carvacrol não alterou ( $p < 0,05$ ; ANOVA duas vias seguida do pós teste Bonferroni), a viscosidade das formulações. Assumindo a curva de viscosidade do gel base (GB) como padrão, nota-se a relação inversa entre o teor de etanol incorporado aos sistemas, contendo carvacrol livre, e a viscosidade. A redução da viscosidade foi mais perceptível para os géis com concentração igual ou superior a 30% de etanol (Figura 24 - A). Nestes sistemas, o etanol é o principal fator à redução da viscosidade. A Figura 24 - B evidencia a similaridade ( $p < 0,05$ ; ANOVA via única seguida do teste Tukey) entre as curvas de viscosidade das formulações das soluções etanólicas associadas à NC (G - Sol. Et 10% + NC *versus* G - Sol. Et. 20% + NC). Comparando-se os perfis viscosimétricos das formulações G-Sol. Et. 10% + NC *versus* AG10% + 1% ativo e G-Sol. Et. 20% + NC *versus* AG20% + 1% ativo, também se constata a similaridade ( $p < 0,05$ ; ANOVA via única seguida do teste Tukey) de comportamento dos géis, não sendo este parâmetro significativamente alterado pelos componentes incorporados (NC ou carvacrol livre). Por fim, destaca-se que o GNC apresentou viscosidade superior às demais formulações desenvolvidas (Figura 24 - B).

A análise da Figura 25 revela que todos os géis apresentaram comportamento pseudoplástico, dada à ausência de relação linear entre as variáveis tensão e taxa de cisalhamento. Este resultado revela a presença de uma rede estruturada nos géis, formada pela interação dos componentes da formulação, a qual é gradualmente quebrada pelo aumento da velocidade de cisalhamento, diminuindo a viscosidade.

Figura 25 - Reograma das formulações semissólidas desenvolvidas. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3).



Legenda: GB = Gel Base; GC = Gel de Carvacrol; GNC = Gel de Nanoemulsão de Carvacrol; G-Sol. Et. 10% + NC = Gel de Solução Etanólica 10% + Nanoemulsão de Carvacrol; G-Sol. Et. 20% + NC = Gel de Solução Etanólica 20% + Nanoemulsão de Carvacrol; AG70% = Álcool Gel 70%; AG10% + 1% ativo = Álcool Gel 10% + 1% ativo; AG20% + 1% ativo = Álcool Gel 20% + 1% ativo; AG30% + 1% ativo = Álcool Gel 30% + 1% ativo; AG40% + 1% ativo = Álcool Gel 40% + 1% ativo; AG50% + 1% ativo = Álcool Gel 50% + 1% ativo; AG60% + 1% ativo = Álcool Gel 60% + 1% ativo; AG70% + 1% ativo = Álcool Gel 70% + 1% ativo.

Os materiais com comportamento pseudoplástico tornam-se cada vez mais fluidos com a aplicação valores de tensão de cisalhamento crescentes (TERRA; MININ; CHORILLI, 2009). A pseudoplasticidade é uma característica bastante desejada e adequada para produtos indicados para aplicação em superfícies, pois após a aplicação da tensão a formulação apresenta facilidade para fluir, levando à formação de filme homogêneo devido ao espalhamento adequado que, por sua vez, favorece a ação pretendida do ativo incorporado de forma uniforme por toda a superfície de contato (TERRA; MININ; CHORILLI, 2009). No caso dos géis contendo NC, associados ou não ao etanol, uma pequena tensão é capaz de diminuir acentuadamente a viscosidade. Desta forma, o material flui com facilidade, garantindo adequada espalhabilidade. No momento em que a tensão é retirada, rapidamente o material se reestrutura e retorna a viscosidades maiores. Neste momento, a formulação já foi aplicada e deverá permanecer no local desejado,

garantindo maior tempo de contato entre a superfície e o ativo que veicula.

Bittencourt e colaboradores (2014), desenvolveram formulações semissólidas de uso vaginal contendo extrato hidroalcólico de própolis vermelha sergipana e observaram que os perfis reológicos das bases gel Aristoflex<sup>®</sup>, gel Natrosol e do creme-gel Hostacerin<sup>®</sup> evidenciaram fluxo não-Newtoniano pseudoplástico. Terra, Minin e Chorilli (2009) observaram que uma formulação anticelulítica acrescida de lipossomas contendo sinefrina e cafeína também apresentaram comportamento pseudoplástico não Newtoniano. Mesmos eventos foram observados por Nemen e Lemos-Senna (2011), ao desenvolverem hidrogéis de hidroxietilcelulose (Natrosol<sup>®</sup>) a partir de diferentes nanocarreadores lipídicos (nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões e microemulsões) contendo resveratrol. Assim como neste trabalho, os referidos autores observaram um aumento da viscosidade entre os géis contendo os nanocarreadores lipídicos em relação ao gel base, sendo que o aumento mais pronunciado ocorreu nos géis contendo nanopartículas lipídicas sólidas, provavelmente devido à presença de partículas sólidas na preparação. Lahoud e Campos (2010) afirmam que a maioria dos fluídos pertencem a este tipo de apresentação farmacêutica, pois não são formas simples, como a água e xaropes, mas sim sistemas coloidais dispersos, incluindo emulsões, suspensões, xampus e os próprios géis.

## **2.2 Avaliação da estabilidade**

### **2.2.1 Monitoramento das propriedades organolépticas**

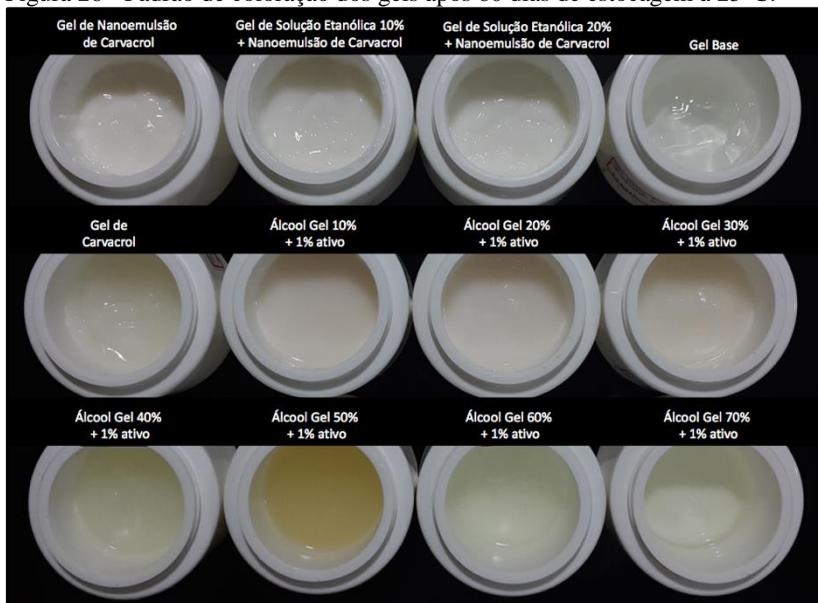
O comportamento das formulações quanto aos parâmetros organolépticos monitorados no início e ao final do período de estocagem encontra-se descrito no Quadro 4.

Quadro 4 - Características organolépticas das formulações semissólidas desenvolvidas durante o estudo de estabilidade. Observação do aspecto visual, cor e odor após 1 e 60 dias de armazenamento, à temperatura ambiente.

Identificação da formulação	Período de observação (dias)	Característica macroscópica		
		Cor	Odor	Aspecto
GB	1º.	Incolor translúcida	Característico	Homogêneo
	60º.	Incolor translúcida	Característico	Homogêneo
GC	1º.	Branca opaca	Característico	Homogêneo
	60º.	Levemente amarelada e opaca	Característico	Homogêneo
GNC	1º.	Branca leitosa com brilho	Característico	Homogêneo
	60º.	Branca leitosa com brilho	Característico	Homogêneo
G-Sol. Et. 10% + NC	1º.	Branca leitosa com brilho	Característico	Homogêneo
	60º.	Branca leitosa com brilho	Característico	Homogêneo
G-Sol. Et. 20% + NC	1º.	Branca leitosa com brilho	Característico	Homogêneo
	60º.	Branca leitosa com brilho	Característico	Homogêneo
AG10% + 1% ativo	1º.	Branca brilhante	Característico	Homogêneo
	60º.	Rosada e opaca	Característico	Homogêneo
AG20% + 1% ativo	1º.	Branca brilhante	Característico	Homogêneo
	60º.	Rosada e opaca	Característico	Homogêneo
AG30% + 1% ativo	1º.	Branca brilhante	Característico	Homogêneo
	60º.	Rosada e opaca	Característico	Homogêneo
AG40% + 1% ativo	1º.	Incolor brilhante	Característico	Homogêneo
	60º.	Levemente amarelada e opaca	Característico	Homogêneo
AG50% + 1% ativo	1º.	Incolor e opaca	Característico	Homogêneo
	60º.	Amarela	Característico	Heterogêneo
AG60% + 1% ativo	1º.	Incolor e opaca	Característico	Homogêneo
	60º.	Levemente amarelada e opaca	Característico	Homogêneo
AG70% + 1% ativo	1º.	Incolor e opaca	Característico	Homogêneo
	60º.	Levemente amarelada e opaca	Característico	Homogêneo
AG70%	1º.	Incolor translúcida	Característico	Homogêneo
	60º.	Incolor translúcida	Característico	Homogêneo

Em todas as formulações o odor característico do carvacrol manteve-se sem sofrer alterações (rancificação) durante o teste. Em apenas uma formulação (AG50% + 1% ativo), ao final período de estudo, foi observada a separação de fases com a consequente perda das características típicas de uma formulação semissólida. Após a determinação das propriedades organolépticas dos géis, no início e ao final do estudo de estabilidade, ficou evidente que o parâmetro que mais sofreu alteração foi a cor da formulação (Quadro 4). É perceptível também que a coloração das formulações contendo etanol associado a 1% do composto livre evidenciou maior alteração ao longo do período de armazenamento (Quadro 4 e Figura 26).

Figura 26 - Padrão de coloração dos géis após 60 dias de estocagem à 25°C.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

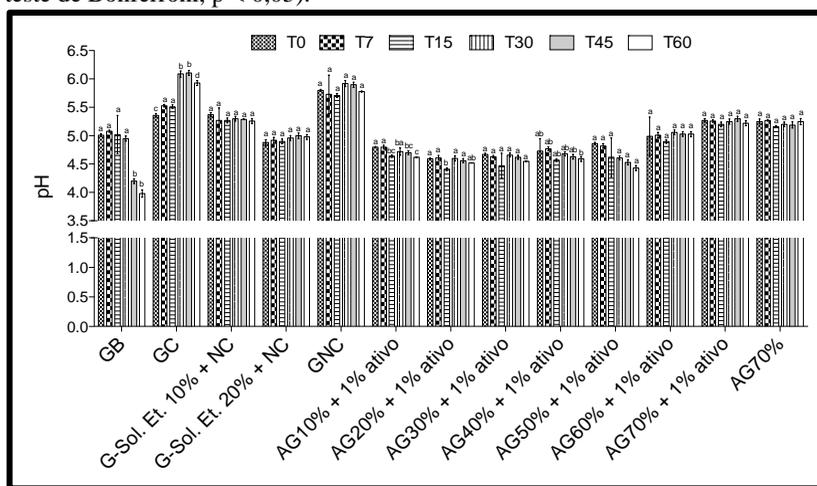
Provavelmente, as alterações de cor observadas ao longo do tempo decorreram da oxidação do ativo livre que fica exposto ao meio (ação do oxigênio) e ao etanol. Essa afirmação ganha reforço dada à ausência de alterações na cor das formulações contendo soluções etanólicas (10 e 20%) e NC, quando comparada às formulações contendo iguais teores de etanol e carvacrol livre (Figura 26). Nestes casos, provavelmente, o processo de nanoencapsulamento confere

proteção ao monoterpene que não entra em contato direto com o meio externo, ou com o álcool adicionado ao sistema. Assume-se que a associação do carvacrol ao sistema de nanoemulsão protegeu o ativo nanoencapsulado contra evaporação e degradação oxidativa durante o armazenamento, aumentando sua estabilidade e, conseqüentemente, prolongando a vida útil do produto final.

## 2.2.2 Determinação do pH

Os valores de pH determinados ao longo do período de investigação da estabilidade dos géis armazenados à 25°C são apresentados na Figura 27.

Figura 27 - Potencial hidrogeniônico dos géis em estudo, armazenados ao longo de 60 dias, à 25°C. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento para uma mesma formulação (ANOVA seguida do teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ ).



Legenda: GB = Gel Base; GC = Gel de Carvacrol; GNC = Gel de Nanoemulsão de Carvacrol; G-Sol. Et. 10% + NC = Gel de Solução Etanólica 10% + Nanoemulsão de Carvacrol; G-Sol. Et. 20% + NC = Gel de Solução Etanólica 20% + Nanoemulsão de Carvacrol; AG70% = Álcool Gel 70%; AG10% + 1% ativo = Álcool Gel 10% + 1% ativo; AG20% + 1% ativo = Álcool Gel 20% + 1% ativo; AG30% + 1% ativo = Álcool Gel 30% + 1% ativo; AG40% + 1% ativo = Álcool Gel 40% + 1% ativo; AG50% + 1% ativo = Álcool Gel 50% + 1% ativo; AG60% + 1% ativo = Álcool Gel 60% + 1% ativo; AG70% + 1% ativo = Álcool Gel 70% + 1% ativo.

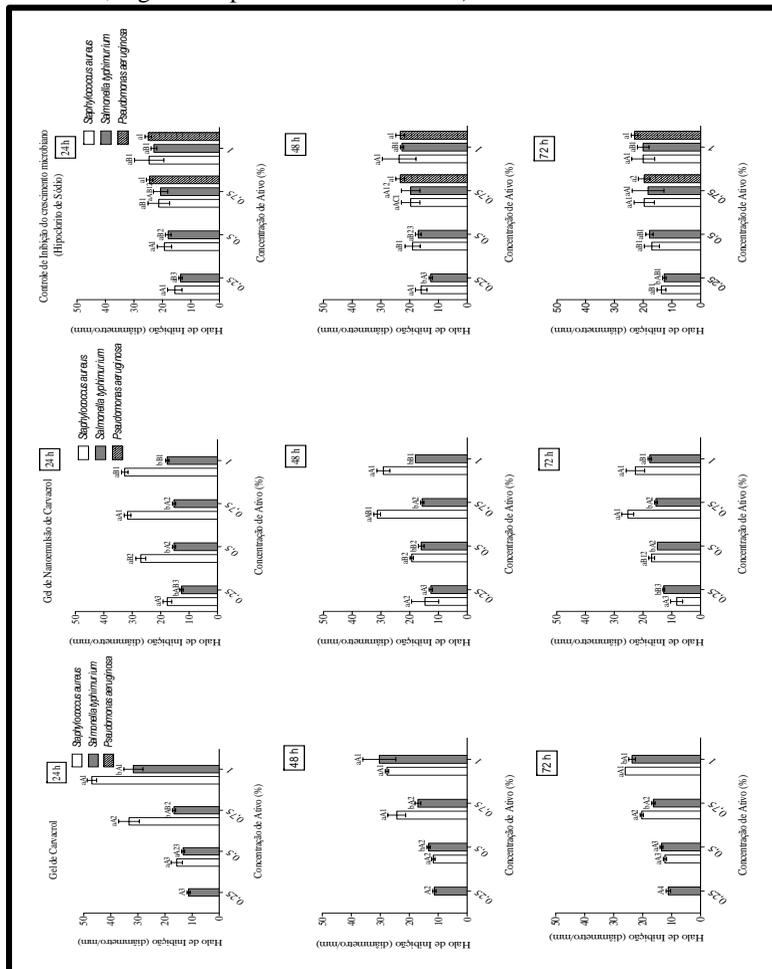
Os valores de pH da formulação GB no início (5,01) e ao término do experimento (3,98) diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Por sua formulação conter apenas água e o polímero Aristoflex AVC® e nenhum tipo de conservante ou estabilizante a acidificação pode indicar a degradação de componentes do sistema, ou ainda a presença de contaminação microbiana. Esse comportamento não foi observado nas demais formulações avaliadas, provavelmente, por estas conterem ao menos um agente antimicrobiano (álcool e/ou carvacrol).

Mesmo após 60 dias de armazenamento à temperatura ambiente, o GNC apresentou a menor amplitude de valores de pH (5,71 a 5,98), sem relevância estatística significativa ( $p < 0,05$ ). Este resultado demonstra que a formulação possui estabilidade físico-química e que a nanoencapsulação promoveu a proteção do ativo contra processos de degradação resultante da ação de vários fatores como a exposição ao calor, luz, oxigênio e umidade. Entre os géis alcóolicos contendo NC não foram observadas variações significativas ( $p < 0,05$ ) de pH entre os momentos amostrais. Entretanto, nas formulações semissólidas AG10% + 1% ativo e AG20% alterações significativas ( $p < 0,05$ ) nos valores daquela variável foram detectadas ao longo do estudo de estabilidade. A formulação GC que, inicialmente, apresentou pH igual a 5,36, com 30 dias de estocagem alcançou valor igual a 6,09 ( $p < 0,05$ ). Novamente, esses resultados sugerem que o ativo livre, após contato com o meio externo (oxigênio) ou com o etanol adicionado à base dermocosmética, pode ter sido oxidado. Em contrapartida, o processo de nanoencapsulação do carvacrol protegeu o ativo contra a degradação, aumentando a estabilidade do produto final. A variação de pH de uma formulação pode modificar as características físico-químicas do ativo veiculado (BUGNOTTO et al., 2006).

### **2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro***

A aferição do diâmetro dos halos de inibição foi realizada após incubação das cepas por 24, 48 e 72 horas, objetivando investigar a atividade antimicrobiana dos tratamentos, frente as condições do ensaio. As médias dos diâmetros dos halos de inibição das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) após contato com o gel de carvacrol (GC), com o gel de nanoemulsão de carvacrol (GNC) e com hipoclorito de sódio, obtidos pelo método de difusão em disco, são apresentados na Figura 28.

Figura 28 - Relação cepa bacteriana e diâmetro médio do halo de inibição (mm) para o gel de carvacrol, gel de nanoemulsão de carvacrol e hipoclorito de sódio. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre bactérias para um mesmo tratamento, concentração e tempo. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre diferentes tratamentos para mesma concentração, tempo e bactéria. Algarismos distintos indicam diferenças significativas entre concentrações para um mesmo tratamento, tempo e bactéria (p < 0,05; ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni).



O perfil de sensibilidade das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) aos antibióticos de interesse foi apresentado no Tópico 2.6.1 (Avaliação da sensibilidade microbiana aos antibióticos) do Capítulo 2. Para todas as cepas testadas, o controle negativo (GB) não induziu a formação de halos de inibição. O álcool gel 70% (AG70%), i.e., controle de inibição de crescimento microbiano, também não se mostrou efetivo como antimicrobiano, provavelmente, devido à volatilização do etanol durante a incubação.

A comparação dos valores de diâmetro dos halos de inibição para as cepas avaliadas no método de difusão em disco (Figura 28) mostra que *S. aureus* foi mais susceptível aos tratamentos com GC e GNC do que a *S. typhimurium*. Também foi possível constatar que a *P. aeruginosa* foi resistente tanto ao tratamento com GC quanto com o GNC, mesmo na maior concentração testada (1%). Frente ao hipoclorito de sódio (controle de inibição do crescimento microbiano) esta cepa foi suscetível apenas nas duas maiores concentrações testadas (1 e 0,75%). Ficou evidente que o GC e o GNC demonstraram maior potencial antimicrobiano contra o *S. aureus* e a *S. typhimurium* do que contra a *P. aeruginosa*. Este fato está, provavelmente, relacionado ao reduzido potencial antimicrobiano do carvacrol sobre bactérias Gram-negativas, devido à presença da membrana externa que age como uma barreira limitando a entrada de compostos hidrofóbicos (MARINELLI; STEFANO; CACCIOATORE, 2018; ROSA et al., 2015; KEAWCHAOON; YOKSAN, 2011; GUARDA et al., 2011). Assim como neste estudo, Sarrazin e colaboradores (2015) avaliaram a eficácia do óleo de *L. origanoides*, rico em carvacrol, contra bactérias de origem alimentar (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*), pelo método de difusão em disco. Os autores constaram que *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27953) se mostrou resistente ao óleo, enquanto a cepa ATTC (S004) de *Salmonella typhimurium* foi sensível, com halo de inibição médio de 27,90 mm para o tratamento com 1,25 µL/mL de óleo.

Observando-se os resultados após 24, 48 e 72 h de incubação constata-se a relação direta, estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), entre a concentração de ativo presente no GC e o diâmetro médio dos halos inibição obtidos para as cepas de *S. aureus* e de *S. typhimurium* (Figura 28), sugerindo que a atividade antimicrobiana deste tratamento é concentração dependente. Diferentemente do que foi observado com o GC, o diâmetro médio dos halos após 24 h de tratamento não variou com a concentração de ativo no GNC, evidenciado a inexistência de

uma relação direta entre aquelas variáveis. A semelhança ( $p < 0,05$ ) do diâmetro médio dos halos, após contato com o GNC, entre os tempos de aferição, é mais evidente na bactéria *S. typhimurium*. Este comportamento sugere um padrão constante de atividade antimicrobiana do GNC ao longo do tempo. Provavelmente, a nanoencapsulação conferiu proteção do ativo reduzindo a volatilização e favorecendo a manutenção da atividade antimicrobiana ao longo do tempo. Essa afirmação ganha reforço, uma vez que, o tratamento com o GNC foi superior ( $p < 0,05$ ) ao GC em sua atividade inibitória do crescimento bacteriano, após 48 h de incubação de *S. aureus*, nas concentrações 0,25, 0,5 e 0,75% (Figura 28).

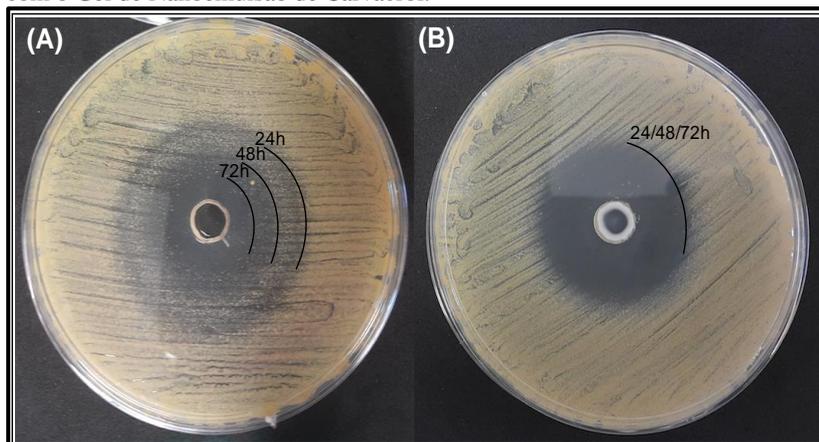
*S. aureus* apresentou resistência frente a menor concentração (0,25%) de CG testada e susceptibilidade ao GNC, após 24, 48 e 72 h de incubação (Figura 28). O maior halo de inibição médio ( $47,00 \pm 1,73$  mm) foi observado para *S. aureus*, 24 h após o tratamento com o GC a 1%. Nas medições realizadas após 48 e 72 h de inoculação, o diâmetro médio dos halos foi reduzido significativamente ( $p < 0,05$ ), para 27,67 e 23,67 mm, respectivamente (Figura 28). Esse comportamento sugere que a atividade antimicrobiana nas primeiras 24 horas foi potencializada pela volatilização do carvacrol incorporado ao gel e não ocorreu somente devido à difusão do GC no meio de cultivo.

Os valores de diâmetros médios dos halos de inibição de *S. aureus*, após 24 h de inoculação revelam que o GC exibiu atividade antimicrobiana superior ( $p < 0,05$ ) ao hipoclorito de sódio somente nas maiores concentrações testadas (0,75 e 1%). Em contrapartida, observa-se que, independente da concentração de GNC testada ou do tempo de incubação, a atividade antimicrobiana mostrou-se igual ou superior àquela do tratamento com hipoclorito de sódio ( $p < 0,05$ ). Estes resultados sugerem que ao longo do período de incubação o controle de inibição de crescimento microbiano teve sua atividade biológica reduzida, provavelmente, devido à evaporação do cloro ativo, enquanto que o carvacrol incorporado ao GNC manteve sua atividade por estar protegido no interior da nanopartícula. Segundo Ludwig e demais pesquisadores (2007), a exposição do hipoclorito de sódio à luz solar ou temperaturas elevadas provoca a liberação de cloro, tornando a solução desinfetante ineficaz.

Conforme ilustrado na Figura 29 - A, a incubação da cepa *S. aureus* com o GC exibiu elevada atividade antimicrobiana após 24 h, a qual foi reduzida, significativamente ( $p < 0,05$ ), com o aumento do tempo de incubação. Este efeito, provavelmente, decorre da evaporação do carvacrol e/ou da dificuldade de difusão do ativo no meio de cultivo

ágar MH. Segundo Shakeri, Shakeri e Hojjatoleslami (2014), o carvacrol livre não apresenta boa dispersão no ágar devido à sua natureza hidrofóbica. Em contrapartida, não foi observada diferença ( $p < 0,05$ ) entre o diâmetro médio dos halos de inibição após 24, 48 e 72 h de contato com o GNC (Figura 29 - B). A manutenção do potencial antimicrobiano do GNC, possivelmente, resulta do processo de nanoencapsulação do carvacrol que age como uma barreira mecânica, protegendo o ativo da oxidação, decomposição fotoquímica e volatilização. Além disso, o GNC apresentou boa difusão no ágar. A presença de colônias isoladas, indicando o fechamento e a redução do tamanho do halo de inibição, somente foi detectada após 72 horas de incubação de *S. aureus* para o tratamento com o GNC (Figura 29 - B).

Figura 29 - Detalhes dos halos de inibição do crescimento de *S. aureus*: (A) após 24, 48 e 72 h de contato com o Gel de Carvacrol; (B) após 72 h de contato com o Gel de Nanoemulsão de Carvacrol.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Lauritano e colaboradores (2016) avaliaram o efeito antimicrobiano de um gel a base de carvacrol e timol, via reação em cadeia da polimerase em tempo real sobre bactérias do “complexo vermelho” causadoras da periondotite (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*). Após análise estatística, não foi observada redução da carga bacteriana em relação ao grupo controle.

O GNC apresentou atividade antimicrobiana frente às cepas de

*S. aureus* e *S. typhimurium*, sugerindo o potencial emprego em produtos com ação desinfetante para uso em superfícies. A manutenção da atividade antimicrobiana por, pelo menos, 72 h indica que o sistema desenvolvido constitui uma boa estratégia para aumentar o tempo de contato do carvacrol nanoencapsulado com a superfície a que se destina a aplicação.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---



- A preparação de sistemas nanoemulsionados contendo carvacrol por duas variantes da técnica de emulsificação espontânea, deslocamento do solvente e auto-nanoemulsificação demonstrou-se viável.
- A técnica de auto-nanoemulsificação mostrou-se particularmente interessante ao desenvolvimento das nanoemulsões de carvacrol, por ser um método que não requer o uso de solventes orgânicos, além de simples execução e fácil escalonamento.
- A NC aumentou, significativamente, a solubilidade do carvacrol em meio aquoso, na forma de nanopartículas carregadas de ativo.
- Um método por espectroscopia de do Uv-Vis foi desenvolvido e validado à quantificação do carvacrol encapsulado. O método mostrou ser específico, linear, exato, preciso e sensível.
- A NC apresentou elevado valor de eficiência de encapsulação, indicando que o carvacrol encontra-se, preferencialmente, associado às nanopartículas, confirmando a adequabilidade deste sistema na encapsulação do ativo hidrofóbico.
- O processo de nanoencapsulação conferiu efeito protetivo ao ativo contra degradação (oxidação por exposição direta ao calor e oxigênio), decomposição fotoquímica e perdas por volatilização, conforme demonstrado pelos estudos de estabilidade e avaliação da atividade antimicrobiana e potencial desinfetante.
- A NC apresentou atividade antimicrobiana superior ao ativo livre contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, sugerindo a aplicabilidade deste sistema em produtos desinfetantes.
- A NC demonstrou ação bactericida similar ao hipoclorito de sódio contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*. O efeito bactericida foi superior ao carvacrol livre, confirmando a eficácia deste sistema como um produto desinfetante e antisséptico.
- A associação do etanol à NC demonstrou-se viável, porém não resultou em aumento da atividade antimicrobiana em cepas de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. typhimurium*.
- A NC revelou-se um eficiente sistema carreador de ativo hidrofóbico, passível de incorporação em outras apresentações farmacêuticas, considerando-se que formulações semissólidas são facilmente preparadas após incorporação do polímero Aristoflex® AVC à NC.
- O gel contendo NC se mostrou efetivo contra *S. typhimurium* e

*S. aureus*, preservando a ação antimicrobiana por tempo superior ao gel contendo o carvacrol livre e ao hipoclorito de sódio.

- Por fim, a NC revelou-se um produto de fácil dispersão em meio aquoso, com acentuada a ação bactericida e potencial desinfetante. Entretanto, para que se possa efetivamente empregar a NC como uma alternativa aos métodos de sanitização ou desinfecção convencionais é necessário aprofundar o conhecimento sobre seu potencial antimicrobiano sobre outros microrganismos patogênicos, avaliando a capacidade desinfetante na presença de substâncias interferentes bem como, o potencial bactericida sob condições que simulem às situações reais à aplicação como um produto desinfetante.

## **REFERÊNCIAS**

---



ACUMEDIA. **Caldo neutralizante D/E (7562)**. v. 05, 2010. Acessado em: dezembro 2018. Disponível em: [http://foodsafety.neogen.com/pdf/Acumedia\\_PI/7562\\_PT\\_PI.pdf](http://foodsafety.neogen.com/pdf/Acumedia_PI/7562_PT_PI.pdf).

AL-NASIRI, G. et al. Optimisation of  $\beta$ -Cyclodextrin inclusion complexes with natural antimicrobial agents: thymol, carvacrol and linalool. **Journal of Microencapsulation - Micro and Nano Carriers**, v. 35, n. 1, 2018.

ALAVINEZHAD, A. et al. Possible therapeutic effect of carvacrol on asthmatic patients: A randomized, double blind, placebo-controlled, Phase II clinical trial. **Phytotherapy Research**, v. 32, p. 151-159, 2018.

ALBERTI, T. et al. Nanotechnology: A promising tool towards wound healing. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, p. 1-14, 2017.

ALCÁNTARA, A. A.; RODRÍGUEZ, E.E.; VARGAS, R. G. Valoración de desinfectantes. Método de dilución-neutralización. **Higiene y Sanidad Ambiental**, v.1, p. 1-5, 2001.

ALENCASTRE, J. B. et al. A study of the characteristics and in vitro permeation properties of chitosan microparticles as a skin delivery system for vitamin E. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 69-76, 2006.

ALLAOUA, M. et al. Pharmacokinetic and antimicrobial activity of a new carvacrol-based product against a human pathogen, *Campylobacter jejuni*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, p. 1162-1174, 2018.

ALMEIDA, J. S. et al. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetable oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 2, p.165-72, 2009.

ALMEIDA, M. E.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Preparação de emulsões submicrométricas: aspectos teóricos sobre os métodos empregados na atualidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 780-788, 2008.

ALVES, E. G. et al. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies

vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ALVES, M. P. et al. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215-220, 2007.

AMPARO, T. R. et al. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity of medicinal plants: the need for standardization. **Infarma: Ciências Farmacêuticas**, v. 30, n. 1, p. 50-59, 2018.

ANDRADE et al. Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* and *Zingiber officinale*: composition, antioxidant and antibacterial activities. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.

ANDRADE, D. C. C.; ARAGÃO, C. C. V.; FURLAN, C. M. Evaluation of physical and chemical stability of sodium hypochlorite solution 0.5% used by farmauscs and its bactericidal efficacy of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 7, n. 21, p. 16-21, 2009.

ANDRADE, D. et al. *In vitro* antimicrobial activity of gel alcohol 70% against hospital and community bacteria. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 40, n. 2, p. 250-254, 2007.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 978-985, 2011.

ARAÚJO, L. S. et al. Composição química e susceptibilidade do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L., família Lamiaceae) frente à cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 33, n. 1, p. 73-78, 2015.

ARAÚJO, M. M.; LONGO, P. L. *In vitro* antibacterial activity of *Origanum vulgare* (oregano) essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-7, 2016.

ARIVALAGAN, S. et. al. Combined therapeutic efficacy of carvacrol and x-radiation against 1,2-dimethyl hydrazine-induced experimental rat colon carcinogenesis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 410(1-2), p. 37-54, 2015.

ASSIS, L. M. et al. *Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods*. **Campinas**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.

AVANCINI, C. A. M.; BOTH, J. M. C. Effect of bactericidal activity of three disinfectants on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 7, n. 2, p. 85-89, 2017.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. e Schlecht. – Guttiferae (“escadinha/sinapismo”), frente diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 1, p. 64-69, 2008.

BAE, Y. M., BAEK, S. Y.; LEE, S. Y. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 465-473, 2012.

BAHAMONDE-NORAMBUENA, D. et al. Polymeric nanoparticles in dermocosmetic. **International Journal of Morphology**, v. 33, n. 4, p. 1563-1568, 2015.

BAILLO, V. P.; LIMA, A. C. Nanotechnology applied to photoprotection. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 3, p. 271-278, 2012.

BAJERSKI, L. et al. The use of Brazilian vegetable oils in nanoemulsions: an update on preparation and biological applications. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 3, p. 347-363, 2016.

BALOURI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K.. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 71-79, 2016.

BANGIA, J. K.; OM, H. Nanoemulsions: a versatile drug delivery tool. **International Journal Pharmaceutical Sciences Research**, v. 6, n. 4, p. 1363-1372, 2015.

BARALDI, P. G. et al. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) channel as emerging target for novel analgesics and anti-inflammatory agents. **Journal of medicinal and pharmaceutical chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5085-5107, 2010.

BARANAUSKAITE, J. et al. Liposomal incorporation to improve dissolution and stability of rosmarinic acid and carvacrol extracted from oregano (*O. onites* L.). **BioMed Research International**, 2018.

BARANAUSKAITE, J. et al. The influence of different oregano species on the antioxidant activity determined using HPLC postcolumn DPPH method and anticancer activity of carvacrol and rosmarinic acid. **BioMed Research International**, 2017.

BARBOZA, F. M. et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico simples e rápido por espectroscopia UV para quantificação de aciclovir em matrizes hidrofílicas de liberação prolongada. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 747-749, 2010.

BARIL, M. B. et al. Nanotechnology applied to cosmetics. **Visão Acadêmica**, v.13, n.1, p. 45-54, 2012.

BASER, K. H. C. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. **Current Pharmaceutical Design**, v. 4, p. 3106-3120, 2008.

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, p. 3989-4006, 2012.

BAUER, A. W. et al. **Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method**. American Journal of Clinical Pathology, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BEENA; KUMAR, D.; RAWAT, D. S. Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 3, p. 641-645, 2013.

BHATT, P.; MADHAV. S. A detailed review on nanoemulsion drug delivery system. **International Journal Pharmaceutical Sciences Research**, v. 2, n. 10, p. 2482-2489, 2011.

BILIA, A. R. et al. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2014.

BITTENCOURT, F. O. et al. Avaliação da atividade antifúngica de formulações semi-sólidas contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v. 10, n. 10, 2014.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BLANK, D. E. Composição química e citotoxicidade de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. **Science and Animal Health**, v. 4, n. 2, p. 117-130, 2016.

BOTH, J. M. C. et al. Actividad desinfectante anti-*Staphylococcus aureus* meticilina resistentes y compuestos flavonoides en *Achyrocline satureioides* Lam. (macela). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 4, 2016.

BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, 280: 241-251, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ANVISA. 2. ed., Brasília, 2008. 120 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº. 14 de 28 de fevereiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC no 50/06, que consta em anexo à presente Resolução. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 05 mar. 2007. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/search.php>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n°. 899, de 29 de maio de 2003 - **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: <[http:// www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acessado em: julho 2018.

BRASIL. **Farmacopéia Homeopática Brasileira**. 3ª ed. Agência nacional de vigilância sanitária - ANVISA, Brasília: Brasília, 2010a. p. 364.

BRASIL. Resolução RDC n°. 35 de 16 de agosto de 2010. Abrange os produtos com ação antimicrobiana destinados ao uso em objetos e ambientes relacionados à assistência à saúde para artigos críticos e semi-críticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 de agosto de 2010. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/search.php>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.

BUGNOTTO, C. et al. Stability study of a topic formulation with propolis. **Revista Disciplinarum Scientia - Série: Ciências da Saúde**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2006.

CAMPANA, R. et al. Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 132–140, 2017.

CAMPANA, R.; BAFFONE, W. Carvacrol efficacy in reducing microbial biofilms on stainless steel and in limiting re-growth of injured cells. **Food Control**, v. 90, p. 10-17, 2018.

CAMPOS, E. V. R. et al. Carvacrol and linalool co-loaded in  $\beta$ -cyclodextrin-grafted chitosan nanoparticles as sustainable biopesticide aiming pest control. **Scientific Reports**, v. 8, 7623, 2018.

CARVALHO, R. I. Lipids, pH, and their interaction affect the inhibitory effects of carvacrol against *Salmonella typhimurium* PT4 and *Escherichia coli* O157:H7. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2018.

CASTELANOS, B. P.; JOUCLAS, V. M. G. Estudo da utilização das

soluções desinfetantes em centro cirúrgico – comparação da sua utilização em alguns hospitais do distrito de São Paulo. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 27, n. 4, 1974.

CHANG, Y.; McLANDSBOROUGH, L.; McCLEMENTS, D. J. Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 8906–8913, 2013.

CHEN, F. et al. Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 1, p. 30-39, 2009.

CHO, Y.; LEE, H. J. Antibacterial effects of carvacrol against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Biomedical Research**, n. 15, n. 3, p. 117-122, 2014.

CHOI, J. G. et al., Antibacterial activity of methyl gallate isolated from galla rhois or carvacrol combined with nalidixic acid against nalidixic acid resistant bacteria. **Molecules**, v. 14, p. 1773-1780, 2009.

CLARIANT, 2013. Product Fact Sheet ARISTOFLEX® AVC: Gelling agent for aqueous systems and thickening agent for oil-in-water emulsions. **Informativo Técnico**: Disponível em: [http://korea.in-cosmetics.com/\\_novadocuments/474438?v=636606549658500000](http://korea.in-cosmetics.com/_novadocuments/474438?v=636606549658500000). Acessado em: 24/07/2018.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**, 7<sup>th</sup> ed. CLSI document M7-A7, Vol. 26, N<sup>o</sup>. 2, USA, 2006.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement**, 9<sup>th</sup> ed. CLSI document M100-S16, Vol. 26, N<sup>o</sup>. 3, USA, 2006.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standart**, 8<sup>th</sup> ed. CLSI document M2-A9, Vol. 26, N<sup>o</sup>. 1, USA, 2006.

COCCIMIGLIO, J. et al. Antioxidant, antibacterial, and cytotoxic

activities of the ethanolic *Origanum vulgare* extract and its major constituents. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016.

CODEVILLA, C. F. et al. Nanostructures containing bioactive compounds extracted from plants. **Ciência e Natura**, v. 37; p. 142-151, 2015.

COLA, D. F. et al. Sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados para ivermectina e metopreno visando controle de parasitas. **Química Nova**, v. 39, n. 9, p. 1034-1043, 2016.

CORDEIRO, M. S. F. et al. Technological development and stability evaluation of dermatological gel from ginger essential oil (*Zingiber officinale* Roscoe), **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 94, n. 2, p. 148-152, 2013.

CORRÊA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, 2005.

CRISTANI, M. T. et al. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6300-6308, 2007.

DAL POZZO, M. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 41, n. 4, p. 667-672, 2011.

DAMASCENO, B. P. G. L. et al. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.

DAVIES, J.; DAVIES, D.. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DEVI, K. P. et al. eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhimurim* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107-115, 2010.

DEY, B. P.; ENGLE, F. B. J.. Comparison of Dey and Engle (D/E) neutralizing medium to Lethen medium and standard methods medium for recovery of *Staphylococcus aureus* from sanitized surfaces. **Journal Microbiology Methods**, v. 14, p. 21-25, 1995.

DEY, B. P.; ENGLE, F. B. J.. Neutralization of antimicrobial chemicals by recovery media. **Journal Microbiology Methods**, v. 19, p. 51-58, 1994.

DEY, B. P.; ENGLE, F. B. J.. Methodology for recovery of chemically treated *Staphylococcus aureus* with neutralizing medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, p. 1533-1537, 1983.

DONSI, F. et al. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, p. 1908-1914, 2012.

ELSHAFIE, H. S. et al. cytotoxic activity of *Origanum Vulgare* L. on hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and evaluation of its biological activity. **Molecules**, v. 22, 1435, p. 1-16, 2017.

ENGEL, J. B. et al. Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, v. 252, p. 18-23, 2017.

EUROPEAN STANDARD 1040:2005 (EN 1040:2005). **Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics: test method and requirements (phase 1)**. London, 2005.

EUROPEAN STANDARD 1276:2015 (EN 1276:2015). **Chemical disinfectants and antiseptics -Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas - Test method and requirements (phase 2, step 1)**. London, 2015.

EUROPEAN STANDARD, 13697:2015 (EN 13697:2015). **Chemical**

**disinfectants and antiseptics - Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas - Test method and requirements without mechanical action (phase 2, step 2).** London, 2015.

EUROPEAN STANDARD, 14885:2015 (EN 14885:2015). **Chemical disinfectants and antiseptics — Application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics**, London, 2015.

FAUSTINO, C. et al. Conceitos básicos de reologia sua aplicação a alimentos, cosméticos e excipientes farmacêuticos. **Química e Ensino**, v. 140, p. 37-41, 2016.

FERREIRA, A. C. et al. Effect of carvacrol tested on different in vivo and in vitro experimental studies: Systematic review. **Clinical Pharmacology Biopharmaceutics**, v, 7. n. 1, 2018.

FISCHER, R.; LAUTNER, H. On the paper chromatographic detection of penicillin preparations. **Archiv der Pharmazie**, v. 294, p. 1-7, 1961.

GALINDO-PÉREZ, M. J. et al. Optimization of the emulsification-diffusion method using ultrasound to prepare nanocapsules of different food-core oils. **LWT - Food Science and Technology**, n. 87, p. 333-341, 2018.

GARCÍA-SALINAS, S. et al. Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of different components of natural origin present in essential oils. **Molecules**, v. 23, 1399, 2018.

GARGI, R. et al. Efficacy study of some antiseptics and disinfectants. **International Journal of Life Sciences**. v. 5, n. 4, p. 593-598, 2017.

GOODALL, R. R.; LEVI, A. A. Microchromatographic method for the detection and approximate determination of the different penicillins in a mixture. **Nature**, v. 158, p. 675-676, 1946.

GOVINDARAJAN, M. et al. Larvicidal potential of carvacrol and terpinen-4-ol from the essential oil of *Origanum vulgare* (Lamiaceae) against *Anopheles stephensi*, *Anopheles subpictus*, *Culex*

*quinquefasciatus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae).

**Research in Veterinary Science**, v. 104, p. 77-82, 2016.

GRAZIANO, M. U. et al. Eficacia de la desinfección con alcohol al 70% (m/v) de superficies contaminadas sin limpieza previa. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 21, n. 2, 2013.

GUARDA, A. et al. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 144–150, 2011.

GUDIÑA, E. J. et al. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.

GUIMARÃES, A. G. et al. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with b-cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico-Biological Interactions**, v. 227, p. 69-76, 2015.

GUIMARÃES, A. G. et al. Evidence for the involvement of descending pain-inhibitory mechanisms in the attenuation of cancer pain by carvacrol aided through a docking study. **Life Sciences**, v. 116, n. 1, p. 8-15, 2014.

GÜNES-BAYIR, A. et al. Effects of carvacrol on human fibroblast (WS-1) and gastric adenocarcinoma (AGS) cells *in vitro* and on Wistar rats *in vivo*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2018.

HAJIMEHDIPOOR, M. et al. A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, n. 23, p. 219-226, 2010.

HALNOR, V. V. Nanoemulsion: A novel platform for drug delivery system. **Journal of Materials Science & Nanotechnology**, v. 6, n. 1, 2018.

HALOCI, E. et al. Development and validation of a GC/FID method for identification and quantification of main components of *Satureja*

*montana* l. Essential oil. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 2, 2014.

HARBARTH, S. et al. Is reduced susceptibility to disinfectants and antiseptics a risk in healthcare settings? A point/counterpoint review. **Journal of Hospital Infection**, v. 87, p. 194-202, 2014.

HOLKEM, A. T. et al. Preparation techniques of nanotechnology systems applied to food. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 87-96, 2015. **Ciência e Natura**, v. 37; p. 142-151, 2015.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A Review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255-264, 2013.

HOOD, J. R.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 428-433, 2003.

HOSSEINI, S. F. et al. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 50 – 56, 2013.

IANNITELLI, A. et al. Potential antibacterial activity of carvacrol-loaded poly(DL-lactide- co-glycolide) (PLGA) nanoparticles against microbial biofilm. **International Journal of Molecular SCIENCES**, v. 12, p. 5039–5051, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Manual da Qualidade: Método da Diluição de Uso**. Rev. 08. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009. Seção 10. 21 p. (65.3210.007 rev. 10).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Manual da Qualidade: Método da Diluição de Uso**. Rev. 12. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2011. Seção 4.3. 30 p. (65.3210.007 rev. 12).

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. ICH. **Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2(R1)**, 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org>>. Acessado em: julho 2018.

ISAAC, V. L. B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n.1, p. 81-96, 2008.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123–127, 2015.

JÚNIOR, E. S. et al. Formation of oil-in-water nanoemulsions containing pomegranate seed oil. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas**, v. 14, n. 1, p. 115-122, 2013.

KABRI, T. et al. Physico-chemical characterization of nanoemulsions in cosmetic matrix enriched on omega-3. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 41, p. 2-8, 2011.

KAMIMURA, J. K. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Food Science and Technology**, v. 57, p. 701-709, 2014.

KANWALE, N. P. et al. Nanoemulsion: a new system for drug delivery. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 11, p. 310-326, 2015.

KARA, M. et al. Supplemental carvacrol can reduce the severity of inflammation by influencing the production of mediators of inflammation. **Inflammation**, v. 38, n. 3, p. 1020-1027, 2015.

KEAWCHAOON, L.; YOKSAN, R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 163–171, 2011.

KHAN, I. et al. Carvacrol nanoemulsion evokes cell cycle arrest, apoptosis induction and autophagy inhibition in doxorubicin resistant-A549 cell line. **Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, p. 1-12, 2018b.

KHAN, I. et al. *In vitro* and *in vivo* antitumor potential of carvacrol nanoemulsion against human lung adenocarcinoma A549 cells via mitochondrial mediated apoptosis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 144, 2018a.

KHATIBI, S. A. et al. Effect of Preparation Methods on the Properties of *Zataria multiflora* Boiss. Essential Oil Loaded Nanoliposomes: Characterization of Size, Encapsulation Efficiency and Stability. **Pharmaceutical Sciences**, v. 20, p. 141-148, 2015.

KOTRONIA, M. et al. Encapsulation of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil in  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD): Synthesis and characterization of the inclusion complexes. **Bioengineering**, v. 4, n. 74, 2017.

KOVALIOVA, T.; POLOVKO, N. The study of properties of polymeric stabilized Emulsions based on Aristoflex<sup>®</sup>. **News of Pharmacy**, v. 1, n. 85, p. 41-44, 2016.

LA STORIA, A. et al. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 164-172, 2011.

LAGE, T. C. A. et al. Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 863-869, 2013.

LAHOUD, M. H.; CAMPOS, R. Theoretical aspects related to pharmaceutical rheology. **Visão Acadêmica**, v.11, n.1, p. 65-73, 2010.

LANDRY, K. S. et al. Effectiveness of a spontaneous carvacrol nanoemulsion against *Salmonella enterica* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 on contaminated broccoli and radish seeds. **Food Microbiology**, v. 51, p. 10-17, 2015.

LANDRY, K. S. et al. Effectiveness of a novel spontaneous carvacrol nanoemulsion against *Salmonella enterica* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 on contaminated mung bean and alfalfa seeds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 187, p. 15-21, 2014.

LANGSRUD, S.; SUNDHEIM, G. Factors influencing a suspension test method for antimicrobial activity of disinfectants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 1006-1012, 1998.

LAURITANO, D. et al. Evaluation of the efficacy of a new oral gel containing carvacrol and thymol for home oral care in the management of chronic periodontitis using pcr analysis: a microbiological pilot study.

**Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents**, v. 30, n. 2, (S1), p. 129-134, 2016.

LIANG, W. Z. et al. The mechanism of carvacrol-evoked  $[Ca^{2+}]_i$  rises and non- $Ca^{2+}$ -triggered cell death in OC2 human oral cancer cells. **Toxicology**, v. 303, p. 152-161, 2013.

LIMA, A. A. S. et al. Sanitizing intended for cleaning: Systematic Review. **Revista e-ciência**, v. 5, n. 1, p. 60-68, 2017.

LIMA, M. S. et. al. Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. **European Journal of Pharmacology**, v. 699(1-3), p. 112-117, 2013.

LIOLIOS, C. C. et al. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity, **Food Chemistry**, v. 112, p. 77–83, 2009.

LIU, F. T. S. et al. Antimicrobial carvacrol in solution blow-spun fish-skin gelatin nanofibers. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 4, p. 984-991, 2018.

LOVELYN, C.; ATTAMA, A. A. Current state of nanoemulsions in drug delivery. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 2, p. 626-639, 2011.

LUDWIG, A. et al. Analysis of active chlorine and pH concentration in samples of sodium hypochlorite 1%. **Revista Sul Brasileira de Odontologia**, v. 4, n. 1, p. 29-33, 2007.

MACIEL, M. J. et al. Phytochemical indicators and antibacterial activity of the crude hydroalcoholic extract of *Achyrocline satureioides* ("macela") against antibiotic-resistant *Salmonella* spp. isolated from animal products (swine and poultry). **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 11, n. 3, p. 273-287, 2017.

MAGI, G; MARINI, E.; FACINELLI, B. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. **Frontiers in Microbiology - Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy**, v. 6, 2015.

MAILLARD, J. Y. Bacterial target sites for biocide action. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 92, p. 16S–27S, 2002.

MANGALE, M. R. et al. Nanoemulsion: as pharmaceutical Overview. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 33, n. 1, p. 244-252, 2015.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 538–544, 1998.

MANSUR, C. R. E. et al. Influência do processo de preparação na estabilidade de nanoemulsões. 9<sup>o</sup>. **Congresso Brasileiro de Polímeros**, 2007.

MAR, J. M. et al. *Lippia organoides* essential oil: An efficient alternative to control *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. **Industrial Crops & Products**, v. 111, 292-297, 2018.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 2, p. 1-37, 2009.

MARINELLI, L.; STEFANO, A.; CACCIATORE, I. Carvacrol and its derivatives as antibacterial agents. **Phytochemistry Reviews**, 2018.

MARTINI, E.; CARVALHO, E.; TEIXEIRA, H. Absorção de oligonucleotídeos em nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 930-934, 2007.

MARYAM, I. et al. Nanoencapsulation of essential oils with enhanced antimicrobial activity: A new way of combating antimicrobial resistance. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 4, n. 3, p. 165-170, 2015.

MASRI, N. M. et al. The immunomodulatory, antimicrobial and bactericidal efficacy of commonly used commercial household disinfectants, sterilizers and antiseptics *in vitro*: putative anti-inflammatory infection control mechanisms and comparative biochemical analysis of the microbial growth of Gram-positive bacteria. **American Journal of Medical and Biological Research**, v. 1, n. 4, p. 103-133, 2013.

MAZZARINO, L. et al. Development and validation of a fluorimetric method to determine curcumin in lipid and polymeric nanocapsule suspensions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, 2010.

McCAY, P. H.; OCAMPO-SOSA, A. A.; FLEMING, G. T. A. Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture. **Microbiology**, v. 156, p. 30–38, 2010.

McDONNELL, G; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: Activity, Action, and Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147–179, 1999.

MEHDI, S. J. et al. Cytotoxic effect of carvacrol on human cervical cancer cells. **Biology and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 307-312, 2011.

MELO, F. H. C. et. al. Antinociceptive activity of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 12, p. 1722-1729, 2012.

MILADI, H. et al. Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strains to nalidixic acid. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 56-63, 2017.

MILLEZI, A. F. et al. Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais (RBPM)**, v. 15, n. 3, p. 373-379, 2013.

MIRA DE BONA, E. A. et al. Comparison of methods for evaluation of antimicrobial activity and determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of aqueous and ethanol plant extracts. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

MISHRA, R. K.; SONI, G. C.; MISHRA, R. P. A review article: on nanoemulsion. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 9, p. 258-274, 2014.

MORAES, J. et. al Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 603-610, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **The Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

MUÑOZ-ACEVEDO, A.; MARTÍNEZ, J. R.; STASHENKO, E. E. Cromatografía de gases como herramienta de estudio de la composición química y capacidad antioxidante de especies vegetales ricas en timol y carvacrol, cultivadas en Colombia. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 1, p. 67-78, 2009.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Antimicrobial activity of the essentials oils: a multifactor approach of the methods. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NAZARZADEH, E.; ANTHONYPILLAI, T.; SAJJADI, S. On the growth mechanisms of nanoemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 397, p. 154–162, 2013.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 408-413, 2011.

NIRMALA, M. J.; NAGARAJAN, R. Recent research trends in fabrication and applications of plant essential oil based nanoemulsions. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 8, n. 2, 2017.

NOGUEIRA-PRISTA, L., ALVES, A. C., MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. II Volume. 6. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. p. 1442, 2008.

NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 519–523, 2007.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future prospectives. **Recent Patents on Anti-Infective**

**Drug Discovery**, v. 7, p. 28-35, 2012.

NUNES, L. C. C. et al. Desenvolvimento de gel vaginal contendo extrato de própolis vermelha. **Revista Brasileira de Farmácia [Internet]**, v. 93, n. 2, p. 179-185, 2012.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Series on Testing and Assessment - No. 129.

**Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests.** Guidelines. Paris, 2010.

Disponível em:

<[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?co te=env/jm/mono\(2010\)20&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?co te=env/jm/mono(2010)20&doclanguage=en)> Acesso em: 28 fev. 2017.

OLIVEIRA, A. D. N. et al. Antibacterial action analysis of domestic use distillers and challenges in correct use: A Review. **Revista de Educação, Meio Ambiente e Saúde**, v. 7, n. 3, p. 57-68, 2017.

OLIVEIRA, T. L. C. et al. Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 546-555, 2011.

OSTROSKY, E. A. et al., Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OUAZZOU, A. A. New insights in mechanisms of bacterial inactivation by Carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 173-185, 2012.

ÖZKAN, A.; ERDOĞAN, A. A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (*Lamiaceae*) and its two major phenolic components. **Turk Journal Biology**, n. 35, p. 735-742, 2011.

PAIVA, S. E.; MURAI, H. C. Eficácia do uso do álcool etílico 70% na anti-sepsia da pele antes da administração vacinal. **Revista de Enfermagem UNISA**, v. 6, p. 85-88, 2005.

PAN, K. et al. Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: physical and antilisterial properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 1649–1657, 2014.

PATEL, H. C. et al. Formulation and evaluation of O/W nanoemulsion of ketoconazole. **Pharma Science Monitor**, v. 4, n. 4(1), p. 338-351, 2013.

PEI, et al. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 7, 2009.

PHARMASPECIAL. s/d. Literatura ARISTOFLEX® AVC, Copolímero do ácido sulfônico acrilóildimetilaurato e vinilpirrolidona neutralizado. **Informativo Técnico**: Disponível em: <http://www.pharmaspecial.com.br/produtos>. Acessado em: 24/02/2016.

PINHEIRO, R. R. et al. Comparing the microbiological evaluation of two domestic-use disinfectants in Brazil by AOAC and ECN recommended methods. **Vigilância sanitária em debate**, v. 3, n. 3, p. 64-69, 2015.

PITTEN, A, F. A.; WERNER, B, H. P.; A. KRAMER, C, A. A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics. **Journal of Hospital Infection**, v. 55, p. 108-115, 2003.

POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. *In*: SIMÕES, C. M. O. *et al* (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2004.

PRAKASH, B. et al. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control**, v. 89, p. 1-11, 2018.

PRESMICH, G. M. A. et al. Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico por Espectrofotometria no UV para Determinação Quantitativa do Anti-Neoplásico  $\beta$ -Lapachona. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 5, p. 645-50, 2010.

PUBCHEM – **Chemistry database**. National Center for Biotechnology Information-NCBI. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/carvacrol#section=Top>. Acessado em: 08 de março de 2017.

REIS, C. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, p. 8-21, 2006.

REIS, L. M. et al. Evaluation of antimicrobial activity antiseptics and disinfectants used in a public health service. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 64, n. 5, p. 870-5, 2011.

ROSA, C. G. et al. Characterization and evaluation of physico-chemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 481, p. 337-344, 2015.

RUSSELL, A. D. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. **The Lancet - Infectious Diseases**, v. 3, p. 794-803 2003.

RUSSELL, A. D. Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 597–599, 2002.

RYU, V. et al. Natural antimicrobial delivery systems: Formulation, antimicrobial activity, and mechanism of action of quillaja saponin-stabilized carvacrol nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 82, p. 442-450, 2018.

SAKEENA, M. H. F. et al. Effects of oil and drug concentrations on droplets size of palm oil esters (POEs) nanoemulsion. **Journal of Oleo Science**, v. 60, n. 4, p. 155-158, 2011.

SÁNCHEZ, C.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G. The effect of carvacrol on enteric viruses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 192, p. 72-76, 2015.

SANTOS, E. H. et al. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 583-592, 2015.

SANTOS, J. C. et al. *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from oregano, garlic, clove and lemon against pathogenic bacteria isolated from *Anomalocardia brasiliiana*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1557-1564, 2011.

SÃO PEDRO, A. et al. The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**, v. 2, p. 1364-1374, 2013.

SARRAZIN, S. L. et al. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia organoides* Kunth. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, n. 145, 2015.

SARTO, M. P. M.; ZANUSSO JUNIOR, G.. Antimicrobial activity of essential oils. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, n. 1, p. 98-102, 2014.

SAVARDEKAR, P.; BAJAJ, A. Nanoemulsions - A Review. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry - IJRPC**, v. 6, n. 2, p. 312-322, 2016.

SCENIHR - Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. **Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides**. Brussels: European Commission; 2009.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e

antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais (RBPM)**, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SCORZONI, L. et al. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v, 28, n. 1, p. 25-34, 2007.

SENRA, T. O. S. et al. Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (E)-cinnamaldehyde, trans-anethole, and linalool on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 4, p. 1461-1466, 2013.

SHAABAN, H. A.; EDRIS, E. A. Factors affecting the phase behavior and antimicrobial activity of carvacrol microemulsions. **Journal of Oleo Science**, v. 64, n. 4, p. 393-404, 2015.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT. P. Nanoemulsion: A Pharmaceutical Review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 24-32, 2010.

SHAKERI, F.; SHAKERI, S.; HOJJATOLESLAMI, M. Preparation and characterization of carvacrol loaded polyhydroxybutyrate nanoparticles by nanoprecipitation and dialysis methods. **Journal Food Science**, v. 79, n. 4, p. 697-705, 2014.

SHARIFI-RAD, M. et al. Carvacrol and human health: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, p. 1-13, 2018.

SILVA, J. P. L. et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30(1), p. 136-141, 2010.

SILVEIRA, L. M. S. et al. Antimicrobial activity methodologies applied to plants extracts: comparison between two agar diffusion techniques. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto

Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2004.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; LIRA, M. C. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, 2008.

SOBRAL-SOUZA, C. E. et al. Avaliação da atividade citotóxica e potencial antiparasitário in vitro do  $\alpha$ -pineno e carvacrol. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 22, n. 2, 2014.

SOKOLIK, C. G. et al. Proteinaceous microspheres as a delivery system for carvacrol and thymol in antibacterial applications. **Ultrasonics – Sonochemistry**, v. 41, p. 288-296, 2018.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 136–141, 2012.

SOTELO-BOYÁS, M. et al. Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103; p. 409–414, 2017.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101–106, 2012.

SOW, L. C. Carvacrol nanoemulsion combined with acid electrolysed water to inactivate bacteria, yeast in vitro and native microflora on shredded cabbages. **Food Control**, v. 76, p. 88-95, 2017.

SUTRADHAR, K. B.; AMIN, L. Nanoemulsions: increasing possibilities in drug Delivery. **European Journal of Nanomedicine**, v. 5, n. 2, p. 97–110, 2013.

SYED, I.; SARKAR, P. Ultrasonication-assisted formation and characterization of geraniol and carvacrol-loaded emulsions for enhanced antimicrobial activity against food-borne pathogens. **Chemical Papers**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11696-018-0501-z>

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

TAGLIARI, M. P et al. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína em nanopartículas de quitosana e alginato. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1228-1232, 2012.

TAMPAU, A.; GONZALEZ-MARTINEZ, C.; CHIRALT, A. Carvacrol encapsulation in starch or PCL based matrices by electrospinning. **Journal of Food Engineering**, v. 214, p. 245-256, 2017.

TERRA, R. S.; MARIANA MIALICK MININ, M. M.; CHORILLI, M. Development and evaluation of physical-chemistry formulation stability increased with liposome containing synephrine and caffeine. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 4, p. 303-308, 2009

TOMASINO, S. F. Development and assessment of disinfectant efficacy test methods for regulatory purposes. **American Journal of Infection Control**, v. 41, p. S72-S76, 2013.

TOZZETTI, D. S., et al. Desinfetantes, eficácia e custo. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 12, 2009.

TREVISAN, D. A. C. et al. Antibacterial and antibiofilm activity of carvacrol against *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 1, 2018.

TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J.. Química analítica de processos. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1065-1071, 2006.

ULLOA, P. A. et al. Modeling the release of antimicrobial agents (thymol and carvacrol) from two different encapsulation materials. **Food Sci Biotechnol**, v. 26, n. 6, p. 1763–1772, 2017.

ULTEE, A. et al. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 5, p. 620–624, 2000.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol in the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and**

**Environmental Microbiology (AEM)**, v. 65, p. 4606-4610, 1999.

UPADHYAYA, I. et al. Rapid inactivation of *Salmonella enteritidis* on shell eggs by plant-derived antimicrobials. **Poultry Science**, v. 92, n. 12, p. 3228-3235, 2013.

USP 29 - **United States Pharmacopeial**, 29 ed. Rev. Rockville. United States Pharmacopeial Convention, Easton, Mack, 2006.

VALERIANO, C. et al. Antimicrobial activity of essential oils against sessile and planktonic pathogens of food source. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.1, p.57-67, 2012.

VAN VUUREN, S.; VILJOEN, A. Plant-based antimicrobial studies-methods and approaches to study the interaction between natural products. **Planta Medica - Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research**, v. 77, p. 1168-1182, 2011.

VELDHUIZEN, E. J. A. et al. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p.1874-1879, 2006.

VENTURELLI, A. C. et al. Avaliação microbiológica da contaminação residual em diferentes tipos de alicates ortodônticos após desinfecção com álcool 70%. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 14, n. 4, p. 43-52, 2009.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

VINCENZI, M. et al., Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75(7-8), p. 801– 804, 2004.

VINCIGUERRA, V. et al. Chemical characterization and antifungal activity of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* essential oils and carvacrol against *Malassezia furfur*. **Natural Product Research**, 2018.

WANG Q. et al. In vitro evaluation of the activity of microencapsulated carvacrol against *Escherichia coli* with K88 pili. **Journal Applied Microbiology**, v. 107:1781-1788, 2009.

WANG, L. H. et al. Membrane destruction and DNA binding of *Staphylococcus aureus* cells induced by carvacrol and its combined effect with a pulsed electric field. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 64, p. 6355-6363, 2016.

WATTANASATCHA, A.; RENGPIPAT, S.; WANICHWECHARUNGRUANG, S.. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agente. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, p. 360– 365, 2012.

WESSELS, S.; INGMER, H.. Modes of action of three disinfectant active substances: A review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 67, p. 456-467, 2013.

WIJESINGHE, L. P.; WEERASINGHE, T. K.. A study on the bactericidal efficiency of selected chemical disinfectants and antiseptics. **Open University of Sri Lanka - OUSL Journal**, v. 6, p. 44- 58, 2010.

WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquidliquid dispersion method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, p. 283-290, 2012.

YAN, F. et al. The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 170–178, 2010.

YUKUYAMA, M. N. et al. Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics – A Review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, p. 13–24, 2016.

ZHOU, D. et al. Carvacrol and eugenol effectively inhibit *Rhizopus stolonifer* and control postharvest soft rot decay in peaches. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, p. 166-178, 2017.

ZORZI, G. K. et al. Biomateriais para formulações de base nanotecnológica visando terapia genética ocular. **Química Nova**, v. 4; n. 1; p. 74-84, 2017.



**APÊNDICE A – Desenvolvimento e validação de método  
espectrofotométrico para quantificação de carvacrol em  
nanopartículas**

---



## 1 INTRODUÇÃO

O carvacrol [2-metil-5-(1-metiletil)-fenol] é um fenol isoprenílico monoterpênico cíclico (BARANAUSKAITE et al., 2018; MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018; FERREIRA et al., 2018; CARVALHO et al., 2018; SHARIFI-RAD et al., 2018; PUBCHEM, 2017; NOSTRO; PAPALIA, 2012; ÖZKAN; ERDOĞAN, 2011; BASER, 2008), chamado de 5-isopropil-2-metilfenol pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC). O carvacrol é um líquido amarelo pálido, com propriedades lipofílicas, insolúvel em água e altamente solúvel em éter etílico, etanol, acetona e hexano (SHARIFI-RAD et al., 2018; PUBCHEM, 2017; VINCENZI et al., 2004). Sua ocorrência é relatada em plantas aromáticas da família Lamiaceae (Labiatae), incluindo espécies dos gêneros *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra*, *Thymus*, *Corydothymus* e *Lippia*, esta última da família Verbenaceae (MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018; FERREIRA et al., 2018; CARVALHO et al., 2018; SHARIFI-RAD et al., 2018; PUBCHEM, 2017; ZHOU et al., 2017; KAMIMURA et al., 2014; NOSTRO; PAPALIA, 2012; BASER, 2008).

Nos últimos anos, os óleos essenciais têm atraído interesse como uma abordagem alternativa na medicina tradicional pela diversidade de atividades biológicas. A presença do fitoconstituente carvacrol, como componente majoritário de óleos essenciais, é reconhecida como marcador de potencial antimicrobiano (OUAZZOU et al., 2012). O carvacrol emergiu como uma molécula potencialmente ativa por apresentar forte atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e negativas (MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018; ALLAOUA et al. 2018; VINCIGUERRA et al., 2018; SYED; SARKAR, 2018; CARVALHO et al., 2018; ENGEL et al., 2018; CAMPANA; BAFFONE, 2018; GARCÍA-SALINAS et al., 2018; RYU et al., 2018; MILADI et al., 2017; ZHOU et al., 2017; WANG et al., 2016; ARAUJO; LONGO, 2016; ARAÚJO et al., 2015; SÁNCHEZ; AZNAR; SÁNCHEZ, 2015; LANDRY et al. 2014; CHO; LEE, 2014; UPADHYAYA et al., 2013; NOSTRO; PAPALIA, 2012; CRISTANI et al., 2007).

Estudos realizados têm atribuído a atividade antibacteriana do carvacrol aos seus consideráveis efeitos sobre as propriedades estruturais e funcionais da membrana citoplasmática. Devido à natureza hidrofóbica, o carvacrol interage com a bicamada lipídica da membrana citoplasmática bacteriana, se alinha às cadeias de ácidos graxos

causando a expansão e desestabilização da estrutura da membrana, aumentando sua fluidez e permeabilidade. Desta forma, os envelopes celulares constituem seu principal alvo de ação (MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018; GARCÍA-SALINAS, 2018; SOW et al., 2017; ARAUJO; LONGO, 2016; MARYAM et al., 2015; NOSTRO; PAPALIA, 2012; OUAZZOU et al., 2012; CRISTANI et al., 2007). Além da atividade antimicrobiana, o carvacrol exerce um amplo espectro de ações biológicas de grande importância em diferentes áreas incluindo anti-inflamatória (ALAVINEZHAD et al., 2018; KARA et al., 2015), antioxidante (BARANAUSKAITE et al., 2017; ÖZKAN; ERDOĞAN, 2011; CHEN et al., 2009), antitumoral (GÜNES-BAYIR et al., 2018; KHAN et al., 2018a; KHAN et al., 2018b; ELSHAFIE et al., 2017), analgésica (GUIMARÃES et al., 2014; MELO et al., 2012; BARALDI et al., 2010) e antiparasitária (SENRA et al., 2013; LAGE et al., 2013; MORAES et al., 2013).

Entretanto, a natureza hidrofóbica e a volatilidade do carvacrol bem como, sua suscetibilidade a oxidação mediada pela luz ou pelo calor, limitaram seu uso (LIU et al., 2018). Diferentes estratégias nanotecnológicas podem ser empregadas visando contornar essas limitações relacionadas as propriedades físico-químicas do carvacrol. Os processos de nanoencapsulamento proporcionam uma barreira protetora ao carvacrol contra processos de degradação e volatilização e, ainda, por melhorar a solubilidade, aumenta a disponibilidade e a eficácia nos sítios de ação de interesse (BARANAUSKAITE et al., 2018; MARINELLI; STEFANO; CACCIATORE, 2018; KOTRONIA et al., 2017). Segundo Liu e pesquisadores (2018), após a nanoencapsulação os ativos antimicrobianos frequentemente mostram atividade melhorada em comparação aos ativos na sua forma *in natura*. Especificamente, o processo de auto-nanoemulsificação (livre de solvente orgânico) apresenta outras vantagens importantes que inclui o aumento da estabilidade do carvacrol durante o armazenamento (HALNOR et al., 2018; NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015), ausência residual de solventes orgânicos na formulação final (NIRMALA; NAGARAJAN, 2017; KANWALE et al., 2015; PATEL et al., 2013; LOVELYN, ATTAMA, 2011) e facilidade de escalonamento do processo de produção (BAJERSKI et al., 2016; MARCATO, 2009; BRUXEL et al., 2012). Dentre as estratégias nanotecnológicas que têm sido empregadas para simplificar e otimizar a aplicação do carvacrol como agente antimicrobiano pode-se citar as nanopartículas (ROSA et al., 2015; SHAKERI; SHAKERI; HOJJATOLESLAMI, 2014; WU; LUO; WANG, 2012;

KEAWCHAOON; YOKSAN, 201; CHEN et al., 2009), as nanocápsulas (IANNITELLI et al., 2011), os lipossomas (BARANAUSKAITE, et al., 2018; ENGEL et al., 2017; LIOLIOS et al., 2009), as microcápsulas (WANG et al., 2009), os complexos de inclusão (AL-NASIRI et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2015; SANTOS et al., 2015) e as nanoemulsões (RYU et al., 2018; SOW et al., 2017; LANDRY et al., 2015; CHANG; McLANDSBOROUGH; McCLEMENTS, 2013; DONSI et al., 2012).

Métodos por cromatografia gasosa (CG) e até mesmo de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) já foram descritos na literatura para a identificação e quantificação do carvacrol em óleos essenciais de diferentes espécies vegetais (KHATIBI, et al., 2015; HALOCI, 2014; MUÑOZ-ACEVEDO; MARTÍNEZ; STASHENKO, 2009; LIOLIOS, 2009; HAJIMEHDIPOOR, 2009). Apesar da elevada sensibilidade e reprodutibilidade, essas metodologias apresentam algumas limitações como o alto custo de instrumentação e operação, tempo relativamente longo de análise, necessidade de experiência no manuseio do equipamento e, ainda, tratamento prévio das amostras (MAZZARINO et al., 2010; SIQUEIRA-MOURA; LIRA; SANTOS-MAGALHÃES, 2008). As técnicas espectroscópicas são as principais concorrentes da CG e para a quantificação de rotina e apresentam a vantagem de serem mais rápidas, com a obtenção de espectros em poucos segundos, além da simplicidade, sensibilidade adequada, conveniência operacional e baixo custo relativo de equipamentos e reagentes (PRESMICH et al., 2010; TREVISAN; POPPI, et al., 2006). As principais técnicas espectroscópicas aplicadas em processos incluem a espectroscopia de absorção, espalhamento, reflexão e emissão nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho, além de espectrometria de massas e técnicas luminescentes. Utilizada há mais de 50 anos, a espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) continua sendo importante para monitoramento de processos de polimerização, biológicos, petroquímicos e farmacêuticos (TREVISAN; POPPI, et al., 2006). O método é baseado na medição da absorbância máxima a um comprimento de onda que caracteriza a substância com adequação nas condições operacionais. Uma relação linear entre a absorbância medida e a concentração do princípio ativo deve ser verificada (PRESMICH et al., 2010).

A quantificação do carvacrol por espectrofotometria UV-Vis, em diferentes sistemas de liberação, é relatada por alguns autores (SHAKERI; SHAKERI; HOJJATOLESLAMI, 2014; KAMIMURA et al., 2014; HOSSEINI et al., 2013; KEAWCHAOON; YOKSAN, 2011).

Contudo, o processo de validação da quantificação do carvacrol por espectrofotometria UV-Vis em sistemas nanoestruturados não é descrito na literatura. O processo de validação é essencial para definir se a metodologia é adequada aos objetivos específicos a que se destina, certificando que o método analítico seja preciso, exato e reproduzível para o tipo de amostra e condições de trabalho utilizadas (BARBOZA et al., 2010; PRESMICH et al., 2010). Assim, como suporte ao desenvolvimento de formulações um método analítico específico e sensível deve ser desenvolvido e validado (MAZZARINO et al., 2010). Neste contexto, o objetivo deste foi desenvolver e validar de um método analítico quantitativo, simplificado, por espectrofotometria de UV-Vis para quantificar o carvacrol em uma nanoemulsão obtida por auto-nanoemulsificação (livre de solvente orgânico), gerando resultados confiáveis e que possam responder satisfatoriamente ao desenho do presente estudo.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAIS**

O carvacrol (grau de pureza = 99,8%), obtido por síntese química, foi gentilmente fornecido pela empresa Quimsar Química Fina Ltda. (Palhoça/SC). O ativo foi alíquotado e envasado com atmosfera modificada (N<sub>2</sub>). As alíquotas foram lacradas e mantidas em freezer a -20°C até utilização. Para o desenvolvimento das nanoemulsões foram empregados Poloxamer 188 (Kolliphor P188 micro, BASF, EUA) e lecitina de soja (Lipoid S75-3N, Lipoid GmbH, EUA) gentilmente doada pela *LIPID Ingredients & Technologies*, Brasil. Os demais solventes e reagentes utilizados para a realização desse trabalho foram acetonitrila grau CLAE (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e água ultrapura em sistema Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, EUA).

### **2.2 MÉTODOS**

#### **2.2.1 Preparação das nanopartículas**

A nanoemulsão contendo carvacrol foi preparada utilizando-se a técnica de emulsificação espontânea livre de solvente (auto-nanoemulsificação) (PATEL et al., 2013). Uma solução contendo 0,25% (p/v) do tensoativo lecitina (Lipoid S75-3N, Lipoid GmbH), dispersa

sob aquecimento à 60°C, e 0,5% (p/v) do tensoativo poloxamer 188 (Kolliphor P188 micro, BASF) foi previamente preparada em água, sob agitação magnética. Em seguida, 98 mL desta fase aquosa foi adicionada sobre a fase oleosa constituída de 1% (p/v) de carvacrol. O sistema foi mantido sob agitação magnética por 30 minutos e o volume ajustado para 100 mL.

### 2.2.2 Espectrofotometria de UV-Vis

No desenvolvimento e validação da metodologia analítica utilizou-se espectrofotômetro UV-Vis (BEL Photonics®) série UV-M51. O comprimento de onda de maior absorvância do carvacrol (275 nm) foi determinado, entre os comprimentos de onda de 240 e 300 nm, utilizando uma cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico (AGILENT®), em temperatura ambiente (25°C).

#### 2.2.2.1 Preparo das soluções padrão

Uma solução mãe foi preparada solubilizando-se 100 mg de carvacrol em 1,0 mL de acetonitrila. A partir desta solução, uma segunda solução de 1,0 mg/mL foi preparada em acetonitrila. Esta solução foi, então, diluída para obtenção de diferentes soluções padrão: 15, 25, 35, 45, 55 e 65 µg/mL de carvacrol em acetonitrila.

#### 2.2.2.2 Validação do Método

Os parâmetros de validação: especificidade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram avaliados segundo os critérios preconizados pela *International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005) e pela Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003).

A confiabilidade dos parâmetros estudados pode ser observada pelo desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (DPR %) das medidas, sendo determinado um DPR menor do 5%, conforme proposto em literatura (BRASIL, 2003). Para cada parâmetro avaliado, foram realizadas análises em triplicata e análise estatística dos resultados obtidos.

### 2.2.2.2.1 Especificidade

A especificidade do método de espectrofotometria de UV-Vis foi avaliada através da análise comparativa entre nanoemulsões brancas (sem ativo) e solução padrão de carvacrol (45 µg/mL), a fim de verificar se os excipientes utilizados nas formulações das nanoemulsões interferem na quantificação do ativo. As amostras foram analisadas por espectrofotometria em triplicata.

### 2.2.2.2.2 Linearidade e intervalo

Foram verificadas através da construção de uma curva de calibração de carvacrol. Soluções padrão de carvacrol em acetonitrila, variando de 15, 25, 35, 45, 55 e 65 µg/mL, foram preparadas, em triplicata, conforme, e analisadas por espectrofotometria. O gráfico da curva de calibração foi obtido plotando as absorbâncias *versus* as concentrações teóricas das soluções padrão. A linearidade foi avaliada através de análise de regressão linear, utilizando ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados. A equação da reta também foi determinada através de regressão linear e o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foi de 0,99, conforme literatura (BRASIL, 2003).

### 2.2.2.2.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de recuperação do ativo. Nanoemulsões brancas (sem ativo) foram contaminadas com concentrações conhecidas de solução padrão de carvacrol em três diferentes níveis (baixa, média e alta), correspondendo a 25, 45 e 65 µg/mL. O percentual de recuperação (R) do ativo foi calculado após análise de absorbância por espectrofotometria de UV-Vis, usando a equação a seguir (Equação 1):

$$R = \left( \frac{C1 - C2}{C3} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

C1 = concentração de carvacrol adicionada às nanoemulsões;

C2 = concentração de carvacrol determinada na nanoemulsão;

C3 = concentração de teórica de carvacrol.

#### 2.2.2.2.4 Precisão

A precisão do método foi determinada avaliando-se a repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdia), ambas expressas como desvio padrão relativo (DPR). A precisão foi avaliada através da análise de soluções padrão contendo diferentes concentrações de carvacrol (25, 45 e 65 µg/mL). A repetibilidade foi avaliada pela medida de cada solução padrão, em triplicata, no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais. A precisão intermediária foi avaliada testando cada solução padrão em três dias diferentes.

#### 2.2.2.2.5 Limite de Quantificação (LQ)

O valor do LQ foi calculado, matematicamente, a partir da curva de calibração resultante da média de três curvas analíticas, sendo definido como a menor concentração na curva de calibração espectrofotométrica do ativo que pode ser medida com precisão e exatidão adequadas. LQ pode ser expresso como (Equação 2):

$$LQ = \frac{10\delta}{S} \quad (2)$$

Onde:

$\delta$  = desvio padrão (DP) do intercepto da curva com o eixo Y da linha de regressão;

S = inclinação da reta (coeficiente angular).

#### 2.2.2.2.6 Limite de detecção (LD)

O valor de LD foi calculado diretamente curva padrão espectrofotométrica, sendo definido como a menor concentração na curva de calibração que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato. LD é expresso como (Equação 3):

$$LD = \frac{3.3\delta}{S} \quad (3)$$

Onde:

$\delta$  = desvio padrão (DP) do intercepto da curva com o eixo Y da linha de regressão;

S = inclinação da reta (coeficiente angular).

### 2.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) e teor de carvacrol nas nanoemulsões

Para a determinação da concentração total (teor) de carvacrol ( $\text{Conc}_{\text{Total}}$ ) presente na suspensão de nanopartículas, 50  $\mu\text{L}$  da formulação foi adicionada em 12,5 mL (q.s.p) de acetronitrila, até a completa dissolução. O teor de carvacrol presente nas suspensões coloidais foi determinado por espectrofotometria UV-Vis e expresso em  $\mu\text{g/mL}$ . Os experimentos foram realizados em triplicata.

A determinação da concentração de ativo associado às nanopartículas (eficiência de encapsulação, EE) foi realizada pelo método de ultrafiltração/centrifugação, onde, 0,5 mL da nanoemulsão foi transferida para unidades de centrifugação Amicon Ultra-0,5 (Ultracel<sup>®</sup>-100 K 100.000 MW; Millipore, Corp., EUA) e centrifugada a 6.000 rpm, durante 40 min, para separar o ativo livre do sobrenadante do carvacrol nanoencapsulado. A EE do carvacrol foi calculada a partir da diferença entre a concentração total de carvacrol ( $\text{Conc}_{\text{Total}}$ ) encontrada nas suspensões de nanopartículas, após sua completa dissolução em acetoneitrila e a concentração de ativo livre presente no ultrafiltrado ( $\text{Conc}_{\text{Ultrafiltrado}}$ ), determinadas em espectrofotômetro (BEL Photonics<sup>®</sup>) a 275 nm. A EE foi calculada conforme Tagliari et al. (2012) (Equação 4):

$$EE = \left( \frac{\text{Conc}_{\text{Total}} - \text{Conc}_{\text{Ultrafiltrado}}}{\text{Conc}_{\text{Total}}} \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde:

$\text{Conc}_{\text{Total}}$  = concentração total de ativo encontrada na nanoemulsão após dissolução das nanopartículas;

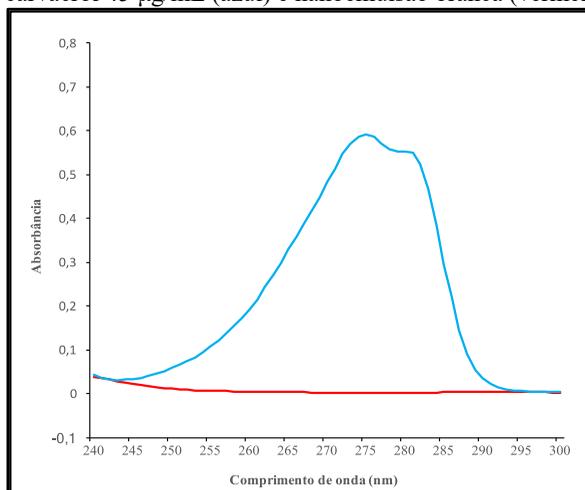
$\text{Conc}_{\text{Ultrafiltrado}}$  = concentração de ativo livre encontrada no ultrafiltrado.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 ESPECIFICIDADE

A especificidade é definida como a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BARBOZA et al., 2010). O espectro de varredura do carvacrol em acetonitrila revelou absorvância máxima no comprimento de onda de 275 nm (Figura 1), resultado este de acordo com estudos prévios utilizando diferentes solventes ou sistemas de encapsulação (SHAKERI; SHAKERI; HOJJATOLESLAMI, 2014; KAMIMURA et al., 2014; HOSSEINI et al., 2013; KEAWCHAOON; YOKSAN, 2011). Os espectros de absorção demonstraram que o método é específico, uma vez que não foi observada interferência dos excipientes da formulação no comprimento de onda de 275 nm, sob as condições empregadas (Figura 1).

Figura 1 - Espectros de varredura, do UV-Vis, obtidos para: solução padrão de carvacrol 45 µg/mL (azul) e nanoemulsão branca (vermelha).



#### 3.2 LINEARIDADE E INTERVALO

Para o intervalo das concentrações estudadas a curva de calibração média, apresentada na Figura 2, após as análises estatísticas

peelo método dos mínimos quadrados, mostrou-se linear na faixa de 15 a 65  $\mu\text{g/mL}$ . Conforme o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) é adequado, pois atende ao critério mínimo aceitável (BRASIL, 2003). A validade do método foi verificada por análise de variância (ANOVA), a qual confirmou a linearidade da equação da reta média, uma vez que, o valor de F calculado foi maior do que o valor de F crítico no nível de 95% de confiança, atestando a capacidade do método de gerar resultados proporcionais às concentrações estudadas (Tabela 1).

Figura 2 - Curva de calibração do carvacrol em acetonitrila.

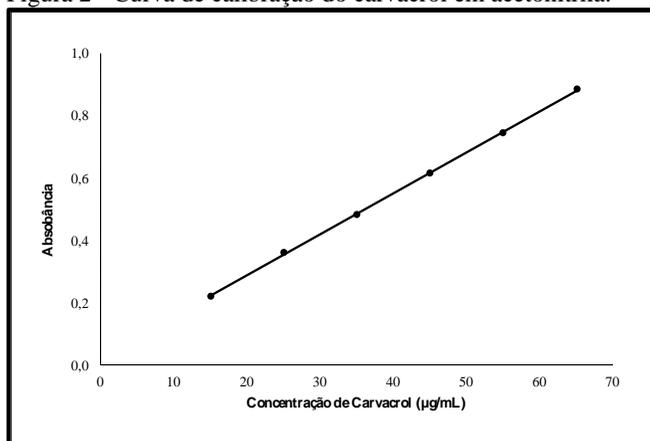


Tabela 1 - Dados referentes à linearidade do método.

Parâmetros	Resultados
Faixa de Linearidade	15 - 65 $\mu\text{g/mL}$
Equação da reta média: $y = ax + b$	$y = 0,0132x + 0,0249$
Inclinação (b) $\pm$ DP*	$0,0249 \pm 0,0065$
Inclinação (a) $\pm$ DP*	$0,0132 \pm 0,0001$
$R^2$	0,9997
$F_{\text{calculado}}$	3272,92
$F_{\text{crítico}}$	3,10

\*DP = Desvio Padrão, (n = 3).

### 3.3 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

A sensibilidade do método foi avaliada pela determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). Os valores calculados foram 1,6455 e 4,9863  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, indicando boa sensibilidade do método para quantificação de carvacrol em sistemas nanoestruturados. Durante o estabelecimento do perfil de liberação a quantidade de ativo liberada varia desde valores extremamente baixos até valores mais elevados, quando ocorre a completa liberação. Assim, valores de LQ baixos são de extrema importância, uma vez que, concentrações reduzidas serão detectadas e quantificadas com segurança (BARBOZA et al, 2010).

### 3.4 EXATIDÃO

De acordo com o ICH, várias abordagens quantitativas podem ser usadas para demonstrar a exatidão do método (ICH, 2005). É recomendável a realização de experimentos de investigação de recuperação, aproximando, ao máximo, as condições do estudo, para que possíveis interferências entre o analito e a matriz empregada no desenvolvimento da formulação possam ser observadas (MAZZARINO, 2010). Neste estudo, a recuperação foi determinada por meio da avaliação da recuperação do carvacrol após contaminação das nanoemulsões brancas com soluções padrão de carvacrol, em três níveis de concentração (baixa, média e alta) conhecidas. Cada nível foi testado três vezes. Os resultados apresentados demonstraram a inexistência de diferenças significativas entre os valores de concentração de carvacrol teóricos e encontrados ( $p < 0,05$ , ANOVA seguida do Teste de Tukey). Os valores de recuperação obtidos variaram de 99,4% a 100,0%, satisfazendo os critérios de aceitação do estudo. Os valores de desvio padrão relativo (DPR) obtidos na avaliação da precisão do método foram menores que 5%. Os resultados demonstram que o método apresentou exatidão adequada (Tabela 2).

Tabela 2 - Recuperação do carvacrol adicionado à formulação branca analisada pelo método proposto. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ou desvio padrão relativo.

<b>Concentração de Carvacrol</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )		<b>Recuperação (%)</b>	<b>DPR**</b> (%)
<b>Teórica</b>	<b>Determinada</b> (Média $\pm$ DP*, n = 3)		
25	24,98 $\pm$ 0,05	99,94	0,21
45	45,00 $\pm$ 0,13	100,02	0,30
65	65,00 $\pm$ 0,19	100,01	0,29

\*DP = Desvio Padrão; \*\*DPR = Desvio Padrão Relativo.

### 3.5 PRECISÃO

A precisão do método foi determinada avaliando-se a repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdia). Os resultados mostraram variabilidades intra e interdia satisfatórias, uma vez que, os valores de DPR foram inferiores a 5,0% (BRASIL, 2003) (Tabela 3). O método desenvolvido foi considerado preciso já que o tratamento estatístico (ANOVA,  $p < 0,05$ ) demonstrou que não há diferenças significativas entre as médias das análises realizadas em diferentes períodos, uma vez que, o valor de F calculado foi menor do que o valor de F crítico (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados obtidos na avaliação da precisão do método espectrofotometria UV-Vis para quantificação de carvacrol. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ou desvio padrão relativo.

Concentração teórica de carvacrol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Dia	Absorbância $\pm$ DP*	DPR** (%)	F <sub>calculado</sub> / F <sub>crítico</sub> Interdia	
25	Intradia (n = 3)	1 <sup>o</sup>	0,361 $\pm$ 0,002	0,786	0,085/5,143
		2 <sup>o</sup>	0,358 $\pm$ 0,004	1,140	
		3 <sup>o</sup>	0,361 $\pm$ 0,012	3,471	
	Interdia (n = 9)	1 <sup>o</sup> ,	0,360 $\pm$ 0,002	0,442	
		2 <sup>o</sup> ,			
		3 <sup>o</sup>			
45	Intradia (n = 3)	1 <sup>o</sup>	0,617 $\pm$ 0,006	0,996	2,343/5,143
		2 <sup>o</sup>	0,627 $\pm$ 0,020	3,234	
		3 <sup>o</sup>	0,605 $\pm$ 0,016	2,656	
	Interdia (n = 9)	1 <sup>o</sup> ,	0,616 $\pm$ 0,011	1,763	
		2 <sup>o</sup> ,			
		3 <sup>o</sup>			
65	Intradia (n = 3)	1 <sup>o</sup>	0,882 $\pm$ 0,010	1,141	0,916/5,143
		2 <sup>o</sup>	0,884 $\pm$ 0,013	1,485	
		3 <sup>o</sup>	0,880 $\pm$ 0,005	0,660	
	Interdia (n = 9)	1 <sup>o</sup> ,	0,882 $\pm$ 0,002	0,261	
		2 <sup>o</sup> ,			
		3 <sup>o</sup>			

\*DP = Desvio Padrão; \*\*DPR = Desvio Padrão Relativo.

### 3.6 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) E TEOR DE CARVACROL

Os resultados obtidos na quantificação do ativo carvacrol presente nas formulações estão resumidos na Tabela 4. A concentração de ativo encontrada no ultrafiltrado, obtido pelo procedimento de ultrafiltração/centrifugação, nas formulações com um e 60 dias de armazenamento foi de 511, 69 e 534, 28  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, indicando que apenas uma concentração muito baixa não foi encapsulada. A alta EE do carvacrol obtida pode estar relacionada à baixa afinidade do ativo hidrofóbico pela fase aquosa externa da formulação. Nas formulações avaliadas, todo carvacrol adicionado foi completamente recuperado, não sendo detectada diferença estatística entre a concentração teórica e mensurada ( $p < 0,05$ ; ANOVA única via seguida do teste de Tukey). Mesmo após 60 dias de armazenamento menos de 6% do ativo não foi recuperado. Nestas formulações, provavelmente, a fração não encapsulada do ativo sofreu algum processo de degradação ou, devido a sua natureza oleosa e elevada

volatilidade, tenha evaporado. Os resultados demonstraram que o método de espectrofotometria de UV-Vis pode ser aplicado com sucesso na determinação do carvacrol nanoemulsionado.

Tabela 4 - Resultados de teor, recuperação e EE do carvacrol nas suspensões coloidais. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ou desvio padrão relativo (n = 3). Letras minúsculas distintas em uma mesma linha indicam diferenças significativas entre concentrações. Letras maiúsculas distintas em uma mesma coluna indicam diferenças significativas entre concentrações ( $p < 0,05$ ; ANOVA única via seguida do teste de Tukey).

Amostra	Tempo de Armazenamento (dias)	Concentração de Carvacrol (mg/mL)		Recuperação (%) $\pm$ DPR**	EE (%) $\pm$ DPR**
		Add.	Men. $\pm$ DP*		
Nanoemulsão de Carvacrol	0	10 <sup>a</sup>	10,03 <sup>3A</sup> $\pm$ 0,124	100,33 $\pm$ 1,24	94,90 $\pm$ 0,34
	60	10 <sup>a</sup>	9,50 <sup>3B</sup> $\pm$ 0,122	95,03 $\pm$ 1,29	94,38 $\pm$ 0,22

\*DP = Desvio Padrão; \*\*DPR = Desvio Padrão Relativo; Add. = Adicionada; Men. = Mensurada; EE = Eficiência de Encapsulação.

## 4 CONCLUSÕES

A metodologia analítica por espectrofotometria na região do UV - Vis para a quantificação do carvacrol em nanoemulsões demonstrou ser específica, linear, precisa e exata, garantindo a qualidade da análise e assim as boas práticas de laboratório e fabricação, segundo os critérios estabelecidos pelos órgãos oficiais (ICH e ANVISA). O método proposto pode ser aplicado com sucesso para a determinação da eficiência de encapsulação e do conteúdo de carvacrol presente nas nanoemulsões desenvolvidas pelo método de auto-nanoemulsificação. Além da importância nos estudos de formulação, o desenvolvimento e validação do método de quantificação é pré-requisito para estudos de estabilidade, estudos de liberação/permeação e estudos pré-clínicos das suspensões de nanopartículas. A metodologia desenvolvida e validada neste estudo constitui, portanto, uma ferramenta útil para quantificação do carvacrol de forma rápida, fácil, com baixo custo de execução e qualidade e segurança adequadas.