

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS

LAIANE SOUZA DA SILVA

**ENCAPSULAÇÃO DE ATIVOS NATURAIS COM ATIVI-
DADE ANTIMICROBIANA EM MATERIAIS DE PAREDE
PROTEICOS E LIPÍDICOS**

MANAUS

2019

LAIANE SOUZA DA SILVA

ENCAPSULAÇÃO DE ATIVOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM MATERIAIS DE PAREDE PROTEICOS E LIPÍDICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Edgar A. Sanches

Co-orientadora: Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura

MANAUS

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586e Silva, Laiane Souza da
Encapsulação de ativos naturais com atividade antimicrobiana em materiais de parede proteicos e lipídicos / Laiane Souza da Silva. 2019
92 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Edgar Aparecido Sanches
Coorientadora: Ani Beatriz Jackisch Matsuura
Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Encapsulamento. 2. Antimicrobiano. 3. Óleos essenciais. 4. Proteínas e lipídios. I. Sanches, Edgar Aparecido II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

PARECER DE BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Nós, da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação de Mestrado da:

Aluno: **LAIANE SOUZA DA SILVA**
Curso: **Ciência e Engenharia de Materiais**
Orientador (a): **Prof. Dr. Edgar A. Sanches**
Título do Projeto: ***"Encapsulação de ativos naturais com atividade antimicrobiana em materiais de parede protéicos e lipídico".***

Em sessão pública realizada no dia 10 de junho de 2019, às 14:00 h, na Sala José Leitão, da Universidade Federal do Amazonas, consideramos o candidato:

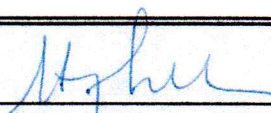
APROVADO

☒

NÃO APROVADO

☐

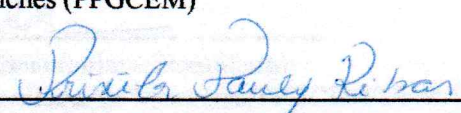
Considerações:



Prof. Dr. Edgar A. Sanches (PPGCEM)

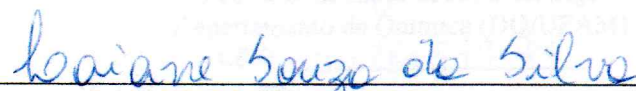


Profa. Dra. Lídia Medina Araujo (DQ/UFAM)



Profa. Dra. Priscila Pauly Ribas (FUCAPI)

Ciente do Aluno:



LAIANE SOUZA DA SILVA

Manaus (AM), 10 de junho de 2019.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, sem Ele não seria e nem conseguiria nada. Todas as minhas conquistas devo a Ele.

À minha mãe **Socorro Souza**, que me trouxe ao mundo e que sempre me ensinou a lutar pelos meus objetivos e por tudo que acredito; e à minha irmã **Laís Souza** pelo carinho.

À minha avó do coração **Carmem de Araújo Cóvas** (*in memoriam*), por todo carinho, incentivo aos estudos, e que todos os dias me perguntava como tinha sido o dia de aula; sei que em algum lugar estais vendo minhas conquistas e espero lhe dar mais e mais orgulho. Saudades eternas!

Ao **Zezinho** (José Carlos de Araújo Cóvas), praticamente pai, por todo apoio, ensinamentos e carinho durante toda minha vida.

Ao Prof. Dr. **Edgar A. Sanches**, meu pai científico (orientador), que sempre acreditou em mim e no meu trabalho, agradeço imensamente pelo apoio principalmente em um dos momentos mais difíceis de minha vida, onde estava lá me apoiando, encorajando e lutando para que eu realizasse o tão sonhado mestrado. Além disso, muito obrigada pela orientação nos trabalhos de iniciação científica e mestrado; e pela contribuição na minha formação profissional e pessoal.

À **Josiana Moreira Mar**, amiga incrível que sempre esteve comigo em todos os momentos bons e ruins tanto da vida acadêmica, como pessoal. Agradeço por ser meu braço direito no trabalho de bancada, pelo apoio e suporte emocional, incentivo, torcida, conselhos, motivação, inspiração e pela amizade, meu muito obrigada!

Aos meus queridos amigos **Wagner Moreira**, **Luana Leão** e **Joed Augusto** pela amizade, companheirismo e suporte que vem desde a graduação até hoje. Por todos os dias e noites de trabalho coletivo de estudo, pela ajuda nos desafios, pelos momentos felizes de comemorações que tivemos e por toda a torcida, obrigada!

Ao Prof. Dr. **Pedro Henrique Campelo Felix** (tio científico e pesquisador incrível), por todo ensinamento, paciência, incentivo, apoio, parceria, pela amizade, por encorajar as publicações sempre, pela confiança, conselhos, enfim, por ter contribuído para a minha formação, muito obrigada!

Aos meus amigos **Sidney Gomes** e **André Andrade**, por todo carinho, conversas, brincadeiras e amizade.

Jamais posso deixar de agradecer a todos os amigos da família do Laboratório NANOPOL: **Adriano Carolino, Ana Farias, André Andrade, Bianca Feitosa, Ítalo Serrão, Kalil Araújo, Jéssica Montenegro, Josiana Mar, Larissa Medeiros, Lilian Rodrigues, Matheus Biondo, Maxwaldo Rabelo, Phillipe Cavalcante, Sidney Gomes, Suzan Xavier, Tiago Veras e Yuri Gomes**, agradeço por ter tido o prazer de conhecer vocês, pelo companheirismo, troca de conhecimento, conversas, brincadeiras e muitas risadas que tornaram os dias de trabalho muito melhores, mais leves e divertidos!

À Profa. Dra. **Jaqueline de Araújo Bezerra**, pelo carinho, amizade, parceria e colaboração neste trabalho, e de muitos outros que virão. É muito bom poder contar com você.

À Dra. **Ani Beatriz Jackisch Matsuura**, pela parceria nos ensaios Microbiológicos, por todo carinho, dedicação em me ensinar e realizar os ensaios. À **Maria Eduarda Grisolia** que também dedicou seu tempo para me ajudar nos ensaios e que não mediu esforços para repetir as análises, e por me ensinar também!

Ao querido **Leonardo Schaidhauer**, por todo cuidado e carinho desde minha passagem pelo Sul até hoje; pelas conversas, apoio e conselhos. Sou muito grata por ter conhecido você!

À Prof. Dra. **Vânia Rodrigues de Lima**, por todo carinho e cuidado sem medida quando me recebeu em Rio Grande – RS no período do estágio no laboratório do seu grupo de pesquisa (GIIMM). Sou muito grata!

À mais nova amiga **Nichole Osti**, por toda a ajuda para o desenvolvimento do trabalho com o grupo GIIMM, por todo ensinamento e troca de conhecimentos. Aproveito para agradecer também a todo o grupo GIIMM em nome de **Marinalva dos Santos, Desirée Magalhães e Monike Konzgen**, pelo acolhimento e carinho que todos tiveram comigo.

Aos meus amigos **Maitê Matos e Luiz Gama**, pela amizade e torcida.

Ao amigo **Túlio de Orleans G. Costa**, pela torcida e incentivo.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro.

À **UFAM**, pela estrutura.

*Uma criança, um professor, uma caneta e um livro
podem mudar o mundo.*

Malala Yousafzai

RESUMO

Com aumento da resistência dos micro-organismos às drogas comerciais, surge a busca por novos antimicrobianos alternativos naturais, como os óleos essenciais. Esta pesquisa visa testá-los contra micro-organismos patogênicos cutâneos que acometem tanto humanos como animais domésticos, como cães e gatos. Através da associação com a nanotecnologia, este trabalho propõe o encapsulamento desses ativos naturais para o desenvolvimento de novos sistemas. Foram selecionadas 5 substâncias naturais ativas: óleo essencial de *Lippia alba* (erva cidreira), *Lippia origanoides* (erva-de-Marajó) e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-Índia); óleo fixo de *Dipteryx odorata* (cumarú) e padrão sintético timol. Os micro-organismos selecionados foram *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus gattii*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentalogrophytes*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton tonsurans*. Para o desenvolvimento de novos materiais carreadores foram selecionados materiais de parede baseados em isolados de soro de leite, gomas e fosfolipídios, visando a avaliação da interação entre o material de parede e as substâncias ativas testadas. Os sistemas foram submetidos às técnicas de caracterização por RMN, UV-vis, DLS, FTIR, CG/EM e análises físico-químicas. Dentre as substâncias testadas, o óleo essencial das espécies *L. origanoides* e *S. aromaticum* apresentaram maior atividade contra os fungos e a bactéria testados. A ação pode ser atribuída aos constituintes majoritários dos óleos, carvacrol, timol e eugenol, que são classificados como compostos fenólicos. Os compostos fenólicos apresentam atividade de catálise enzimática de polifenoloxidase, que é capaz de oxidar a quinonas, causando efeito tóxico aos micro-organismos. Dentre os materiais de parede, os isolados do soro de leite e o fosfolipídio (asolecitina de soja) apresentaram melhor interação com os óleos essenciais das espécies *S. aromaticum* e *L. origanoides* quando encapsulados. Tanto os materiais de parede proteicos quanto o lipídico apresentaram eficiência de encapsulação satisfatória. Os sistemas que demonstraram melhor interação e estabilidade foram os WPI e os Aso contendo o conservantes timol e MI. Acredita-se que esta pesquisa possa ser considerada como o início de um processo de desenvolvimento de um produto nanotecnológico de controle alternativo dos fungos e bactéria testados.

Palavras Chave: Encapsulamento, Antimicrobiano, Óleos essenciais, proteínas e lipídios.

ABSTRACT

With increasing of the resistance of microorganisms to commercial drugs, the search for new natural alternative antimicrobials, such as essential oils, has become important. This research aims to test these essential oils against cutaneous pathogenic organisms that affect both humans and domestic animals, such as dogs and cats. Through the association with nanotechnology, this work proposes the encapsulation of these natural actives for the development of new formulations. Five natural active substances were selected: essential oil of *Lippia alba*, *Lippia origanoides* and *Syzygium aromaticum*; fixed oil of *Dipteryx odorata* and synthetic timol. The selected microorganisms were *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus gattii*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Microsporium canis*, *Trichophyton mentalogrophytes*, *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton tonsurans*. For the development of new carrier materials, wall materials based on whey isolates, gums and phospholipids were selected to evaluate the interaction between the wall material and the active substances. The systems were submitted to the characterization techniques by NMR, UV-vis, DLS, FTIR, GC/MS and physico-chemical analysis. Among the tested substances, the essential oil of the specimens *L. origanoides* and *S. aromaticum* showed higher activity against the fungi and bacteria tested. The action can be attributed to the major constituents of oils, carvacrol, thymol and eugenol, which are classified as phenolic compounds. Phenolic compounds have the activity of enzymatic catalysis of polyphenoloxidase, which is capable of oxidizing quinones, causing a toxic effect on microorganisms. Among the wall materials, whey isolates and phospholipid (soybean asolecitina) showed better interaction with the essential oils of the species *S. aromaticum* and *L. origanoides* when encapsulated. Both the protein and lipid wall materials exhibited satisfactory encapsulation efficiency. The systems that demonstrated better interaction and stability were WPI and Aso containing the thymol and MI conservants. This research may be considered as the beginning of a developing process of a nanotechnological product based on natural actives for the control of the tested fungi and bacterium.

Keywords: Encapsulation, Antimicrobial, Essential oils, proteins and lipids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: (A) Sementes de <i>Dipteryx odorata</i> , (B) folhas de <i>Lippia alba</i> , (C) broto de <i>Syzygium aromaticum</i> , (D) folhas de <i>Lippia origanoides</i> e (E) fórmula estrutural do timol. .	22
Figura 2: Cinética de extração dos óleos essenciais por hidrodestilação. CR = óleo essencial do cravo-da-Índia (<i>S.aromaticum</i>); EC = óleo essencial da erva cidreira (<i>L.alba</i>) e EM = óleo essencial da erva-de-marajó (<i>L. origanoides</i>).	32
Figura 3: (A) Espectro de RMN ^1H (11,74 T, CDCl_3) do óleo das sementes da espécie <i>D. odorata</i> e (B) Ampliação da região olefinica e aromática.	36
Figura 4: Mapa de correlações HSQC (11,74 T, CDCl_3) do óleo essencial das sementes da espécie <i>D. odorata</i> .	37
Figura 5: Mapa de correlações HMBC (11,74 T, CDCl_3) do óleo essencial das sementes da espécie <i>D. odorata</i> .	37
Figura 6: Estrutura molecular da Cumarina.	38
Figura 7: Curva de calibração de ácido gálico utilizada no ensaio de fenóis totais.	38
Figura 8: Atividade enzimática de polifenoloxidase dos óleos essenciais <i>L. alba</i> , <i>L. origanoides</i> , <i>S. aromaticum</i> , óleo vegetal de <i>D. odorata</i> e do padrão timol.	40
Figura 9: Placa do ensaio com <i>A. fumigatus</i> CFAM 1490. Os círculos delimitam visualmente maior esporulação do fungo.	42
Figura 10: Placa do ensaio com <i>C. albicans</i> CFAM/ILMD-FIOCRUZ.	43
Figura 11: Placa do ensaio com <i>C. gattii</i> Amostra clínica.	43
Figura 12: Placa do ensaio com <i>S. aureus</i> CBAM 629.	44
Figura 13: Encapsulação de uma substância ativa (princípio ativo) em um material de parede hipotético. Os sinais (+) representam as cargas (hipotéticas) externas da partícula, relacionadas à estabilidade do sistema.	49
Figura 14: Representação das proteínas que apresentam maior porcentagem na composição dos Isolados do soro do leite.	50
Figura 15: Testes preliminares com diferentes materiais encapsulantes: (A) Goma Arábica, (B) Goma Carragena, (C) Isolado Concentrado de Leite – WPC, (D) Isolado do Soro de Leite – WPI, (E) Isolado Hidrolisado de Leite – WPH e (F) Goma Xantana.	54
Figura 16: (A) Emulsões de Isolado de Soro de Leite – WPI, (B) Isolado Concentrado de Leite – WPC e (C) Isolado Hidrolisado de Leite – WPH.	55
Figura 17: Imagem do microencapsulado em pó obtido a partir do Isolado Proteico de Soro – IPS liofilizado.	56
Figura 18: Espectros de FTIR das micropartículas protéicas contendo os óleos essenciais das espécies <i>S. aromaticum</i> e <i>L. origanoides</i> .	58

Figura 19: Representação estrutura molecular da fosfatidilcolina.	61
Figura 20: Representação de partícula de lipossomos em bicamada.	62
Figura 21: Espectros de HATR-FTIR do sistema de lipossomos contendo somente Aso.	69
Figura 22: Espectros de HATR-FTIR dos sistemas de lipossomos contendo somente Aso/CR com conservantes.....	70
Figura 23: Espectros de HATR-FTIR dos sistemas de lipossomos contendo somente Aso/EM com conservantes.....	71
Figura 24: Variação de largura e frequência das medidas de HATR-FTIR dos sistemas lipossomais contendo <i>S. aromaticum</i> e conservantes.....	72
Figura 25: Variação de largura e frequência das medidas de HATR-FTIR dos sistemas lipossomais contendo <i>L. origanoides</i> e conservantes	73
Figura 26: RMN de T_1 da colina e metileno das amostras contendo óleo de <i>S. aromaticum</i>	74
Figura 27: RMN de T_1 da colina e metileno das amostras contendo óleo de <i>L. origanoides</i>	75
Figura 28: RMN de ^{31}P da amostra de lipossomas contendo óleo essencial de <i>L. origanoides</i> e <i>S. aromaticum</i>	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Relação dos micro-organismos teste	30
Quadro 2: Parâmetros utilizados nas análises de FTIR	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores do índice de refração, teor de umidade, rendimento e densidade dos óleos essenciais e fixo	33
Tabela 2: Constituintes químicos do óleo essencial da espécie <i>L. origanoides</i> obtidos por CG/EM.....	34
Tabela 3: Constituintes químicos do óleo essencial da espécie <i>L. alba</i> obtidos por CG/EM	35
Tabela 4: Constituintes químicos do óleo essencial da espécie <i>S. aromaticum</i> obtidos por CG/EM.....	35
Tabela 5: Teor de fenóis totais presentes determinado por equivalência a ácido gálico	38
Tabela 6: Atividade enzimática polifenoloxidase (PFO)	40
Tabela 7: Valores dos halos de inibição dos óleos essenciais, óleo fixo e do padrão timol frente aos micro-organismos testados	41
Tabela 8: Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais das espécies <i>S. aromaticum</i> e <i>L. origanoides</i> frente as leveduras	45
Tabela 9: Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais das espécies <i>S. aromaticum</i> e <i>L. origanoides</i> frente aos dermatófitos	45
Tabela 10: Teor de umidade dos sistemas de Isolados de Soro de Leite (WPI, WPC e WPH) contendo os óleos e o padrão microencapsulados.....	56
Tabela 11: Eficiência de Encapsulação (EE), Teor de Óleo Superficial (OS) e Retenção de Óleo das micropartículas proteicas contendo os óleos essenciais das espécies <i>S. aromaticum</i> e <i>L. origanoides</i>	57
Tabela 12: Valores de turbidez dos sistemas de lipossomos Aso e Aso/CR.....	66
Tabela 13: Valores do potencial zeta (ζ) e tamanho de partículas por DLS.	68
Tabela 14: Variação de T_1 e ^{31}P dos lipossomos contendo óleo essencial da <i>S. aromaticum</i>	77
Tabela 15: Variação de T_1 e ^{31}P dos lipossomos contendo óleo essencial da <i>L. origanoides</i>	78
Tabela 16: Eficiência de encapsulação dos Lipossomos contendo óleo essencial da <i>S. aromaticum</i> e <i>L. origanoides</i>	79

LISTA DE SÍMBOLOS E ACRÔNICOS

% – Porcentagem

ζ – Potencial zeta

Δ – Variação

AC – Ácido cítrico

ASO – Asolecitina de soja

BHI – Brain Heart Infusion

BS – Benzoato de sódio

CG/DIC – Cromatografia gasosa acoplada a detector por ionização em chamas

CG/EM – Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CM – Óleo fixo de Cumaru

CR – Óleo essencial de cravo (*S. aromaticum*)

DLS – Dispersão de luz dinâmica (Dynamic Light Scattering)

EAG – Equivalência a ácido gálico

EC – Óleo essencial de Erva cidreira (*L. alba*)

EE – Eficiência de encapsulação

EM – Óleo essencial de Erva do Marajó (*L. origanoides*)

eV – Elétron volts

GA – Goma arábica

GC – Goma carragena

GX – Goma xantana

h – Hora

HATR-FTIR – Reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (Horizontal Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared)

IPS – Isolados Proteicos de Soro

IR – Índice de refração

PFO – Polifenoloxidase

LUV – Vesículas Unilamelares Grandes

m – Metros

mg – Miligrama

MHz – Megahertz

MI – Conservante Conserv MI

min – Minutos

mL – Mililitros

mm - Milímetros

mM – Micromolar

mV – Milivolts

NE – Conservante Conserv NE

nm – Nanômetros

ppm – Parte por milhão ($\mu\text{g/mL}$)

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

s – Segundos

SAB – Sabouraud dextrose

TIM – Timol (padrão referência)

μL – Microlitros

UV-vis – Ultravioleta visível

WPI – Isolado do soro de leite

WPC – Isolado do soro de leite concentrado

WPH – Isolado do soro de leite hidrolisado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 Gerais	19
2.2 Específicos	19
CAPÍTULO I	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 Seleção de Óleos e Padrão Analítico com possíveis Propriedades Antimicrobianas	21
3.1.1 Cumaru (<i>Dpteryx odorata</i> Aubl.)	21
3.1.2 Erva cidreira (<i>Lippia alba</i>)	22
3.1.3 Erva-de-Marajó (<i>Lippia origanoides</i>)	23
3.1.4 Cravo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	23
3.2 Micro-organismos	24
3.2.1 Bactérias	24
3.2.2 Fungos	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Obtenção dos Compostos Ativos a serem Encapsulados	27
4.2 Propriedades Físico-químicas	27
4.2.1 Teor de Umidade	27
4.2.2 Índice de Refração	28
4.3 Determinação de Teor de Fenóis Totais e Polifenoloxidase	28
4.4 Caracterização Química dos Óleos Essenciais por Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG/EM)	28
4.5 Caracterização Química do óleo vegetal de <i>D. odorata</i> por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	29

4.6 Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	29
4.6.1 Micro-organismos testados	29
4.6.2 Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	30
4.6.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5.1 Caracterização Físico-química dos Óleos Essenciais	32
5.1.1 Cinética de Extração, Índice de Refração (IR), Teor de Umidade, Rendimento e Densidade.....	32
5.2 Caracterização Química dos óleos essenciais por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)	33
5.2.1 Caracterização Química do óleo vegetal de <i>D. odorata</i> por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	36
5.3 Determinação de Fenóis Totais e Polifenoloxidase (PFO)	38
5.4 Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	41
5.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	45
CAPÍTULO II.....	47
6. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	48
6.1 Gomas, Isolados Proteicos de Soro (IPS) como Materiais Encapsulantes	48
6.2 Gomas (Arábica, Carragena e Xantana)	49
6.3 Isolados Proteicos de Soro (IPS)	50
7. MATERIAIS E MÉTODOS	51
7.1 Síntese de Micropartículas contendo os Ativos Encapsulados	51
7.2 Teor de Umidade	51
7.3 Molhabilidade dos Sistemas de IPS	52
7.4 Medida de Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR.....	52
7.5 Eficiência de Encapsulação (EE)	53
8. RESULTADOS E DISCUSSÕES	54

8.1 Micropartículas Proteicas	54
8.2 Teor de Umidade das Micropartículas Proteicas	56
8.3 Teor de Óleo Superficial e Eficiência de Encapsulação das Micropartículas Proteicas	57
8.4 Análise por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	58
CAPÍTULO III	60
9. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	61
9.1 Lipossomos	61
10. MATERIAIS E MÉTODOS	63
10.1 Síntese de Nanopartículas de Lipossomos pelo Método de Hidratação de Vesículas	63
10.2 Eficiência de Encapsulação (EE)	63
10.3 Medidas de HATR - FTIR do Nanossistema Lipossômico	64
10.4 Medidas de Turbidez do Nanossistema Lipossômico	64
10.5 Medidas de ^1H (Medidas de T_1) e ^{31}P do Nanossistema Lipossômico	64
10.6 Medidas de DLS e Potencial Zeta (ζ) do Nanossistema Lipossômico	65
11. RESULTADOS E DISCUSSÕES	66
11.1 Nanopartículas Lipossomais	66
11.2 Medidas de Turbidez	66
11.3 Medidas de DLS e Potencial Zeta (ζ)	67
11.4 Medidas de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (HATR-FTIR)	68
11.5 Análise por Ressonância Magnética (RMN)	74
12. CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
13. REFERÊNCIAS	83

1. INTRODUÇÃO

A pele representa uma barreira eficaz contra infecções causadas por fungos e bactérias. Porém, o contato com micro-organismos que danificam o tecido podem resultar em quadros infecciosos. Essas lesões podem afetar uma região delimitada ou propagarem-se por regiões extensas. As infecções causadas por fungos são chamadas de dermatofitoses, e os três gêneros principais de dermatófitos são *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton* (DALLA LANA et al., 2016). Por outro lado, a piodermite também é uma infecção cutânea que causa lesões na pele ocasionadas principalmente pelas bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pyogenes*. A ocorrência de infecções bacterianas primárias pode variar de acordo com diversos fatores (PIRES et al., 2015), incluindo as infecções hospitalares.

O tratamento dos quadros infecciosos que acometem a pele geralmente é realizado com drogas antimicrobianas comerciais. Além do pouco arsenal de drogas eficientes, atualmente vivenciamos um quadro de resistência antimicrobiana, o que resulta na necessidade de busca por novas drogas que possuam atividade contra micro-organismos causadores de doenças infecciosas. Dessa forma, a investigação de novos antimicrobianos naturais representa uma das alternativas, assim como o estudo de novos materiais e o uso da nanotecnologia para o desenvolvimento de novos carreadores de substâncias ativas.

Na tentativa de encontrar uma alternativa viável para essa realidade, os produtos de origem vegetal surgem como uma rica fonte de pesquisa na busca de drogas que revertam a resistência bacteriana, ou simplesmente sejam eficazes no combate desses micro-organismos. As espécies vegetais constituem uma rica fonte de potentes inibidores e diversos fitoconstituintes vem sendo identificados (CHAVES et al., 2018; RODRIGUES et al., 2018). Nesta perspectiva, os óleos essenciais são importantes candidatos antimicrobianos pois, devido aos princípios ativos de substâncias que constituem uma mistura complexa, a eficiência na ação e a capacidade de desenvolvimento de resistência podem diminuir consideravelmente.

Os antimicrobianos naturais a base de óleos essenciais representa uma alternativa atrativa para oferecer tratamento de doenças ocasionadas por micro-organismos patogênicos, tanto em humanos como animais domésticos, sendo muitas vezes uma alternativa mais saudável, segura e menos agressiva. Adicionalmente, o uso de

nanotecnologia vem possibilitando o desenvolvimento de novas plataformas que podem contribuir para aplicações que visam o combate desses micro-organismos.

Neste contexto, a técnica de encapsulamento de ativos representa uma importante ferramenta que permite a proteção de substâncias ativas em nano/micropartículas desenvolvidas a partir de materiais de parede específicos, que resultam na preservação das propriedades biológicas desses ativos, possibilitando projetar possíveis mecanismos de liberação controlada.

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo testar o potencial dos óleos essenciais das espécies *Lippia origanoides* (erva-de-Marajó), *Lippia alba* (erva cidreira), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-Índia), além do óleo fixo da espécie *Dipteryx odorata* (Cumaru) e do padrão sintético timol, frente a alguns micro-organismos responsáveis, principalmente, por infecções cutâneas, como *Staphylococcus aureus*, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Cryptococcus gattii*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Aspergillus fumigatus*. A partir dessa verificação, foram desenvolvidas micropartículas baseadas em materiais de parede poliméricos e lipossômicos, que serviram de carreadores para o encapsulamento das substâncias ativas mais eficazes.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

- Desenvolver sistemas particulados antimicrobianos para encapsulação de óleos essenciais das espécies *Lippia origanoides* (erva-de-Marajó), *Lippia alba* (erva cidreira), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-Índia), do óleo fixo da espécie *Dipteryx odorata* (cumaru) e do padrão sintético timol, visando o combate de micro-organismos causadores de infecções cutâneas.

2.2 Específicos

- Caracterizar as propriedades físico-químicas dos ativos selecionados e dos materiais encapsulados;
- Identificar quantitativa e qualitativamente a composição química dos óleos essenciais e fixo através de Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG/EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de núcleo de hidrogênio ^1H ;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos ativos selecionados frente à bactéria *Staphylococcus aureus* pela técnica de microdiluição;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos ativos selecionados frente aos fungos *Microsporum canis*, *Trichophyton mentalogrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Cryptococcus gattii*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Aspergillus fumigatus* pela técnica de microdiluição;
- Desenvolver sistemas particulados com diferentes materiais de parede (proteicos e lipídicos) visando a encapsulação dos ativos selecionados;
- Determinar a eficiência de encapsulamento dos sistemas encapsulados.

CAPÍTULO I

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Importantes pesquisas vêm sendo desenvolvidas com finalidades de busca de substâncias ativas naturais que possam apresentar alguma atividade de destaque (como atividades larvicidas, inseticidas, calmantes, bactericidas, fungicidas etc.), além de visar possíveis substituições de substâncias sintéticas que vêm causando danos aos seres humanos, aos animais e ao meio ambiente. Essas atividades geralmente estão presentes nos óleos essenciais ou fixos de espécies vegetais. Por outro lado, algumas substâncias químicas presentes nos óleos essenciais ou fixos, e que possuem importantes atividades quando testadas isoladamente, já vêm sendo desenvolvidas sinteticamente ou são isoladas quimicamente, como é o caso do timol, carvacrol, safrol etc., que são conhecidos também como padrões analíticos.

Dentro desse contexto, nossa região representa uma importante fonte de recursos vegetais que podem ser investigados sob o ponto de vista químico, biológico e farmacológico, podendo revelar importantes espécies vegetais capazes de apresentar essas atividades desejadas. Por essa razão, foi escolhido o óleo fixo da espécie *Dpteryx odorata*, os óleos essenciais das espécies *Lippia alba*, *Lippia origanoides* e *Syzygium aromaticum*, além do timol sintético. Esses óleos e o padrão analítico foram escolhidos por apresentarem pronunciadas atividades antimicrobianas (BARRETO et al., 2014; NUNES et al., 2018; RAJESH et al., 2018). Na sequência serão abordados alguns aspectos gerais sobre cada uma dessas espécies escolhidas, além do padrão timol.

3.1 Seleção de Óleos e Padrão Analítico com possíveis Propriedades Antimicrobianas

3.1.1 Cumaru (*Dpteryx odorata* Aubl.)

A espécie *D. odorata* (Aubl.) pertence à família Fabaceae, e é conhecida como cumaru ou cumaru-verdadeiro. Suas sementes são mostradas na **Figura 1 (A)**. A árvore de cumaru possui caule que pode atingir cerca de 30 m de altura e 60 cm de diâmetro em mata primária. Possui flores vermelhas ou violetas, de cheiro marcante e agradável, recobrendo toda a copa no período de floração. Seus frutos têm forma de drupa, de cor verde-amarelada que, quando maduros e secos, abrem-se e expõem a

semente extremamente aromática. A dispersão dos frutos ocorre intermitentemente, sendo mais pronunciada entre os meses de novembro e março (BESSA, 2001; SILVA et al., 2010). Alguns trabalhos vêm mostrando importantes atividades antimicrobianas da espécie *Amburana cearensis* (DE MOURA et al., 2013). No entanto, não há trabalhos reportando possíveis atividade antimicrobianas da espécie *D. odorata*, motivo pelo qual será utilizado seu óleo fixo nesta pesquisa.

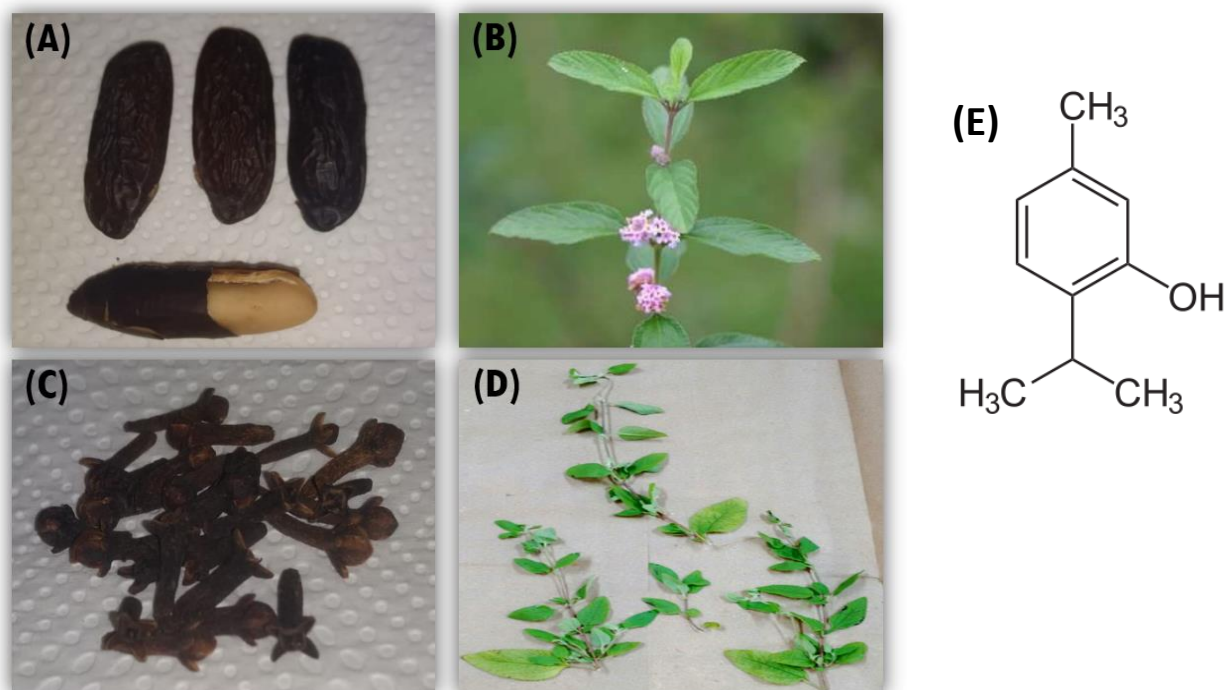


Figura 1: (A) Sementes de *Dipteryx odorata*, (B) folhas de *Lippia alba*, (C) broto de *Syzygium aromaticum*, (D) folhas de *Lippia origanoides* e (E) fórmula estrutural do timol.

Fonte: A autora (2019).

3.1.2 Erva cidreira (*Lippia alba*)

Esta espécie pertence à família Verbenaceae, de ocorrência nas Américas Central e do Sul, habitando praticamente em todas as regiões do Brasil, onde é predominantemente empregada com finalidades medicinais (TAVARES, E.S. L.S. JULIÃO, D. LOPES, H.R. BIZZO, C.L.S. LAGE, 2005). Popularmente, a *L. alba* é conhecida como erva cidreira do campo, alecrim do campo, cidreira brava, falsa melissa, erva cidreira brasileira, entre outros (**Figura 1 (B)**). Apresenta altura máxima de 2 m e pode ser encontrada em solos arenosos e nas margens dos rios em regiões de clima tropical. As substâncias responsáveis pelas propriedades aromáticas e terapêuticas

da desta espécie são secretadas pelos tricomas glandulares e pelas células do parênquima clorofiliano em forma de óleo essencial, os quais são compostos voláteis de aroma forte e agradável (CAMÊLO, L. C. A.; BLANK, A. F.; EHLERT, P. A. D.; CARVALHO, C. R. D.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; MATTOS, 2011). Alguns trabalhos vêm mostrando importantes atividades antimicrobianas desta espécie (DE AQUINO et al., 2010; DE SOUZA et al., 2017; TOFIÑO-RIVERA et al., 2016), motivo pelo qual será utilizado seu óleo essencial nesta pesquisa.

3.1.3 Erva-de-Marajó (*Lippia origanoides*)

O gênero *Lippia* (família Verbenaceae) compreende cerca de 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, com ampla disseminação. A *L. origanoides* Kunth. é um arbusto aromático nativo da América Central e do norte da América do Sul. É popularmente conhecida como Erva-de-Marajó (**Figura 1 (D)**), alecrim da Angola e sálvia-do-marajó, sendo reconhecida como uma importante planta medicinal com elevada concentração e variedades de flavonóides. Os principais constituintes do óleo essencial da *L. origanoides*, carvacrol e timol, foram relatados por possuírem efeito antitumoral, propriedades anti-carcinogênicas, atividades antioxidante, inseticida, larvicida e acaricida, além de atividade antimicrobiana contra vários grupos patogênicos, bem como repelência significativa e baixa toxicidade (MAR et al., 2018a; OLIVEIRA et al., 2014). Por essas razões, o óleo essencial desta espécie foi selecionado para esta pesquisa.

3.1.4 Cravo (*Syzygium aromaticum*)

A espécie *S. aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (sinônimo: *Eugenia caryophyllata*), popularmente conhecida como cravo-da-Índia, é pertencente à família Myrtaceae. Sua árvore é de grande porte, atingindo cerca de 15 m de altura. É nativa das Ilhas Maluku, na Indonésia. A produção de botões florais, parte comercializada da árvore, inicia-se depois de 4 anos de plantação. No Brasil, o cravo (**Figura 1 (C)**) é cultivado na região Nordeste, no Estado da Bahia. Os grandes países produtores de cravo ainda são Indonésia, Índia, Madagascar e Tanzânia (CORTÉS-ROJAS; DE SOUZA; OLIVEIRA, 2014; OLIVEIRA et al., 2009). O óleo essencial produzido pelos

botões florais apresenta alto rendimento na extrações, além de ampla atividade biológica (CORTÉS-ROJAS; DE SOUZA; OLIVEIRA, 2014). Por essas razões, o óleo essencial desta espécie foi selecionado para esta pesquisa.

3.1.5. Timol

O timol (2-isopropil-5-metilfenol) é um composto fenólico, cristalino, derivado do terpeno 3-hidroxi-*p*-cimeno e sua produção em plantas está associada à sua estratégia defensiva contra microrganismos fitopatogênicos. Sua fórmula estrutural está ilustrada na **Figura 1 (E)**. Numerosos estudos relatam suas propriedades antibacterianas e fungicidas (MARCET et al., 2018; MARCHESE et al., 2016). O timol é frequentemente encontrado como constituinte químico de algumas especiarias, incluindo tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e orégano (*Origanum heracleoticum* L.), dentre outras espécies (YOUSEFI et al., 2018). Por essas razões, o padrão sintético do timol foi selecionado para esta pesquisa.

3.2 Micro-organismos

A intenção desta pesquisa é verificar as atividades antimicrobianas dos óleos selecionados e do padrão timol frente aos micro-organismos *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus gattii*, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* e *Staphylococcus aureus*. Esses micro-organismos foram selecionados porque vêm ocasionando diversos problemas relacionados à saúde humana e de animais domésticos, como cães e gatos. Abaixo serão abordados aspectos gerais sobre cada um dos micro-organismos escolhidos.

3.2.1 Bactérias

As bactérias são organismos procariotos que se reproduzem por divisão assexuada. A parede bacteriana é complexa, consistindo de uma parede celular com uma camada espessa de peptidoglicano (MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, 2014). A classificação atual das bactérias baseia-se principalmente em características morfológicas e bioquímicas (LEVINSON, 2011). O tamanho (1 a 20 µm ou maior), a

forma (esferas, bastões, espirais), e o arranjo espacial (células únicas, cadeias, aglomerados) das células são utilizados para sua classificação preliminar (MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, 2014).

Staphylococcus são cocos Gram-positivos, catalases positivos que formam arranjos semelhantes a "cachos de uva", anaeróbios facultativos, e sensíveis à lisostafina. O gênero *Staphylococcus* é composto por 33 espécies, 17 das quais podem ser isoladas de amostras biológicas humanas, já que fazem parte da microbiota da pele e da mucosa de alguns mamíferos (RATTI; SOUSA, 2009).

Essa bactéria pode produzir infecções oportunistas importantes como as cutâneas crônicas, relativamente benignas, até infecções sistêmicas potencialmente fatais em diferentes sítios de colonização. A *S. aureus* é considerada uma das principais causadoras de patologias de infecções hospitalares, dentre outras manifestações clínicas (SOUZA et al., 2005). Os agentes etiológicos mais comumente implicados na endocardite são *Streptococcus*, *Staphylococcus*, bacilos Gram-negativos e *Bartonella* spp. É isolado, com frequência, de cães e gatos (VOLL; VENTURA, 2011).

Outro ponto importante a ser relatado sobre as bactérias refere-se à atual situação de resistência. Em 2014, a Organização Mundial de Saúde (OMS), no relatório intitulado "*Antimicrobial Resistance: Global Report on surveillance*", revelou a problemática da resistência bacteriana no mundo. Segundo o documento, vivenciamos atualmente a era "pós-antibióticos", uma vez que em algumas regiões o uso de antibióticos não se faz eficaz. O problema também parece ser particularmente agudo nas economias emergentes. Entretanto, países desenvolvidos também são afetados em grande escala por estes microrganismos: nos Estados Unidos os casos de *S. aureus* resistentes à meticilina apresentam taxa de mortalidade maior que os casos de morte por HIV e Hepatite B (CDDEP - CENTER FOR DISEASE DYNAMICS, 2018). No Brasil, o programa de vigilância antimicrobiana descreveu uma prevalência de 30,9% de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) nos pacientes hospitalizados no período de 1997 a 2000 (CARAÇA, A. A. B.; SISTI, 2016).

3.2.2 Fungos

Os fungos são organismos eucarióticos e se apresentam pela morfologia como leveduras ou fungos filamentosos. Leveduras crescem na forma de células únicas,

que se reproduzem assexuadamente por brotamento. Os fungos filamentosos crescem como filamentos longos (hifas) com formação de micélio (LEVINSON, 2011). Apresentam grande importância na produção e deterioração de alimentos, porém, existem fungos causadores de patogenicidade aos humanos.

De acordo com os tecidos e órgãos afetados, as micoses são classificadas em micoses superficiais, micoses cutâneas (pele, unhas e pelos), micoses subcutâneas e micoses sistêmicas (BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, 2004).

As espécies de *Aspergillus* crescem em culturas, como fungos filamentosos hialinos. As colônias de *Aspergillus* podem ser pretas, marrons, brancas ou de outras cores, dependendo das condições de crescimento e variedades de espécies. A aspergilose comporta um amplo espectro de doenças causadas por membros do gênero *Aspergillus* (MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, 2014).

Cryptococcus gattii são leveduras que variam de esférico ao oval, e medem entre 2 e 20 µm de diâmetro. Normalmente produzem um único brotamento, mas algumas vezes brotamentos múltiplos ou em cadeias podem estar presentes (LEVINSON, 2011). A criptococose pode se apresentar como um processo pneumônico ou uma infecção do Sistema Nervoso Central (SNC). Em alguns casos, a micose pode se disseminar amplamente, apresentando formas cutânea, mucocutânea, dentre outras.

Todas as espécies de *Candida*, leveduras ovais (3 a 5 µm), produzem brotamentos ou blastoconídios. *C. albicans*, o agente etiológico mais comum da candidíase humana, pode ser encontrada também em animais domésticos. *C. albicans* é um patógeno oportunista que pode causar infecções locais e sistêmicas em pessoas predispostas, comumente afetando pacientes imunologicamente comprometidos e aqueles submetidos a tratamentos prolongados com antibióticos (DUARTE, 2005). A *Candida parapsilosis* é outra espécie que está cada vez mais frequente nos casos de infecção fúngica em pacientes graves.

Os fungos dermatófitos são micro-organismos que possuem afinidade por tecidos de estruturas queratinizadas, como pelos, unhas e pele. Em estado de patogenia dá-se o nome de dermatofitoses e os gêneros que englobam as espécies patogênicas são *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos Compostos Ativos a serem Encapsulados

As folhas da espécie *L. organoides* foram coletadas na zona rural da Ilha de Marajó no interior do Estado do Pará – PA, a exsicata identificada foi depositada no herbário da Universidade Federal do Amazonas, sob nº 10224; as folhas da espécie *L. Alba* foram coletadas na Embrapa – AM, localizada na Rodovia AM 010, Km 29, s/n, Manaus – AM, onde também a exsicata identificada foi depositada no herbário do Laboratório de Botânica da Embrapa, sob nº 191732; o broto da flor da espécie *S. aromaticum* e as sementes da espécie *D. odorata* foram adquiridos no Mercado Municipal Adolpho Lisboa, em Manaus – AM. Todas as espécies estudadas possuem cadastro no SisGen sob o nº A26CD5E.

As amostras passaram por um processo de lavagem em água corrente seguido de secagem em estufa a 45 °C até a obtenção de massa constante. O material seco foi triturado em moinho de facas e, em seguida, cada espécie vegetal foi submetida ao processo de hidrodestilação em um extrator do tipo Clevenger para a obtenção do óleo essencial. Para a obtenção do óleo de Cumaru, as sementes foram previamente secas em estufa, trituradas em moinho de facas e submetida a extração por aquecimento, a temperatura branda de 45 °C, por 2h. O óleo foi separado por centrifugação e armazenado em frasco âmbar.

Foram selecionadas quatro espécies vegetais para a extração de óleo, além do padrão timol (2-isopropyl-5methylphenol) com pureza de 99% (Sigma-Aldrich® - T0501).

4.2 Propriedades Físico-químicas

4.2.1 Teor de Umidade

O teor de umidade foi determinado para o material vegetal de cada espécie, sendo avaliado nas folhas de *L. alba* e *L. organoides*, na semente de *D. odorata* e no broto de flor de *S. aromaticum*. As micropartículas encapsulantes constituídas de IPS na forma de pó também tiveram seu teor de Umidade avaliado. A análise foi realizada em um equipamento analisador de umidade da marca BEL ENGINEERING® (modelo i-Thermo 163L, Italy) a 105 °C. A programação das medidas foi realizada segundo a norma ABNT (NBR 9656).

4.2.2 Índice de Refração

O índice de refração dos óleos essenciais e do óleo fixo foram medidos em um refratômetro de bancada Master Refractometer Atago® (modelo 2612 Master-RI). Foi adicionada uma gota de óleo essencial no prisma, a 25 °C, e em seguida foi realizada a leitura.

4.3 Determinação de Teor de Fenóis Totais e Polifenoloxidase

Para a determinação do teor fenólico foi preparada uma solução de 1N de Folin – Ciocalteu e, para um volume de 100mL, foi adicionado uma quantidade de 6 g de NaHCO_3 , conforme descrito por (SLINKARD AND SINGLETON, K. SLINKARD, 1977). As amostras foram preparadas em uma concentração de 1mg/mL em solvente metanol. Realizou-se a análise com a inserção de 20 μL de amostra, 150 μL da solução de Folin – Ciocalteu em repouso por 5 min. Em seguida, foram adicionados 150 μL da solução de NaHCO_3 e mantida em repouso por 90 min. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-vis em 750 nm. Determinou-se o teor de fenólicos totais por equivalência a ácido gálico (EAG) através da curva de calibração previamente obtida.

Para a determinação da atividade de polifenoloxidase (PFO) foi empregada a metodologia de (DUANGMAL; OWUSU APENTEN, 1999), com adaptações. Foi utilizado como substrato catecol (20 mM) solubilizado em tampão fosfato de potássio (100 mM), pH 6,0. Foram solubilizados 2800 μL de substrato e 200 μL de extrato enzimático, previamente preparado, a 30 °C. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro UV-vis, em 395 nm, a cada 1 min, por 10 min. Avaliou-se a oxidação de catecol convertendo-se em quinona, mediada pela enzima de estudo, obtendo-se resultados expressos em $\text{UE s}^{-1} \text{mL}^{-1}$.

4.4 Caracterização Química dos Óleos Essenciais por Cromatográfica Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG/EM)

Na análise por CG/EM foi utilizada a coluna DB5-MS. Gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura do injetor foi de 240°C, com temperatura inicial do forno de 60°C, mantida em isoterma por 2 min, seguida por uma rampa de temperatura a 3°C/min até 250°C, e por outra rampa a 10 °C/min até 290 °C, mantendo-se em condição isoterma por 5 min. As análises foram realizadas

em triplicata e os resultados expressos pela média da porcentagem de área normalizada relativa dos picos cromatográficos.

Na análise por CG/DIC foi utilizada uma coluna capilar DB-5 (5% difenil, 95% polidimetilsiloxano) (30 m x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura do filme). Gás hélio foi utilizado como gás de arraste, com fluxo de 1,0 mL/min. A injeção em modo split 1:10 foi realizada com o injetor a 250 °C e o detector de ionização por chama a 290 °C. A temperatura programada para o forno foi de 60 a 290 °C a 3 °C/min. Foram injetados padrões de hidrocarbonetos lineares C₈ a C₄₀ para a determinação dos índices de retenção nas mesmas condições cromatográficas. Para a detecção foi aplicada a técnica de impacto eletrônico a 70 eV.

A determinação da composição química dos óleos essenciais foi realizada com base nos dados dos espectros de massas, obtidos por CG/EM e índices de retenção obtidos por CG/DIC. Os índices de retenção foram calculados utilizando a Equação de van der Dool-Kratz, relacionando os tempos de retenção das substâncias presentes nos óleos essenciais com os tempos de retenção de hidrocarbonetos lineares (C₈ – C₄₀). Os índices de retenção e os espectros de massas foram comparados com dados das espectrotescas Wiley 7.0, NIST, Pherobase e da literatura (ADAMS, 2007).

4.5 Caracterização Química do óleo vegetal de *D. odorata* por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A análise do óleo vegetal de cumaru foi realizada no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMR-Lab) da Universidade Federal de Amazonas (UFAM). O espectro de RMN ¹H e os mapas de correlações, HSQC e HMBC foram adquiridos em um espectrômetro da Bruker® Avance IIIHD (11,74 T, BBFO Plus SmartProbe™) a 298 K. Uma alíquota do óleo vegetal foi solubilizada com clorofórmio deuterado. O padrão utilizado foi o TMS. O software TopSpin™ 3.5 foi usado para processar os espectros.

4.6 Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Determinação da Concentração Inibitória Mínima

4.6.1 Micro-organismos testados

Os micro-organismos testados (**Quadro 1**) foram cedidos por coleções e pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Micologia da Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz Amazônia), onde também foram realizados os ensaios microbiológicos.

Quadro 1: Relação dos micro-organismos teste

Espécies testadas	Tipos de micro-organismo	Procedência das cepas
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fungo filamentoso	Coleção CFAM1490/ILMD-FIOCRUZ
<i>Candida albicans</i>	Levedura	Coleção ILMD-FIOCRUZ
<i>Candida parapsilosis</i>	Levedura	ATCC 22019
<i>Cryptococcus gattii</i>	Levedura	Coleção CFP60/INI-FIOCRUZ
<i>Cryptococcus gattii</i>	Levedura	Amostra clínica
<i>Microsporum canis</i>	Fungo filamentoso	Amostra clínica
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Fungo filamentoso	Amostra clínica
<i>Trichophyton rubrum</i>	Fungo filamentoso	Amostra clínica
<i>Trichophyton tonsurans</i>	Fungo filamentoso	Amostra clínica
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactéria	Coleção CBAM629/ILMD-FIOCRUZ

4.6.2 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Para os ensaios antimicrobianos utilizou-se a técnica de difusão em disco descrita por (BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, 1966), utilizando o padrão timol e os óleos de *L. origanoides*, *L. alba*, *S. aromaticum* e *D. odorata*. O ensaio foi realizado em meio Sabouraud Dextrose Agar para os fungos e Brain Heart Infusion Agar (BHI) para a bactéria. Os meios de cultura foram esterilizados por 15 min a 121 °C para posterior aplicação de 50 mL em placas de Petri (150 mm) estéreis. Para este teste foram utilizados apenas alguns dos micro-organismos teste e que apresentam crescimento rápido: *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. gattii* e *S. aureus*.

Os inóculos foram preparados a partir de colônias da bactéria e dos fungos (leveduras e a cepa de *A. fumigatus*) cultivadas em meio Brain Heart Infusion Agar (BHI) e Sabouraud Dextrose (SAB), e após 24 e 48 h de crescimento a 30°C, foi feito a homogeneização das células em solução salina 0.9% para turvação 0.5 e 1.0 MacFarland, respectivamente. Um swab estéril foi mergulhado na suspensão do inóculo para a sementeira em placas de Petri, as quais foram incubadas em estufa a 37° C

por 24h para a bactéria e 48 h a 72h para os fungos - leveduras e a cepa de *A. fumigatus*. Após esse período realizou-se a leitura para a determinação da atividade antimicrobiana dos óleos.

4.6.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O ensaio para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizado em microplacas (96 poços) contendo 80 µL de caldo (SAB ou Mueller-Hinton) onde foram acrescidos 100 µL das soluções dos óleos e do padrão timol. Posteriormente, foram distribuídos 20 µL das suspensões dos micro-organismos em cada poço, com exceção dos poços que contém o branco (constituído apenas por caldo SAB ou Mueller-Hinton) e nos poços de controle das substâncias. Além das substâncias-teste (óleos), foram realizados os controles positivos (o antibiótico Penicilina, para a bactéria e o antifúngico Anfotericina B, para os fungos) e negativo (contendo os caldos SAB ou Mueller-Hinton mais o inóculo).

Para a determinação da CIM todos os microrganismos listados no **Quadro 1** foram utilizados. A bactéria e as leveduras foram crescidas e o inóculo preparado conforme descrito no item 4.6.2. Os dermatófitos foram cultivados por 14 dias a 30°C, também em meio Sabouraud Dextrose (SAB) e após a raspagem das colônias a suspensão resultante foi analisada por espectrofotômetro em UV-vis em 530 nm até absorbância entre 0,15 a 0,17 (equivalente a escala de aproximadamente 0,6 a 1,4 x 10⁶ cels/mL).

A microplaca contendo a bactéria foi incubada por 24 h, as espécies de *Candida* por 48 h, *Cryptococcus* por 72 h e aquela contendo os dermatófitos foi incubada por 5 dias, todas em 37 °C e, após esse período, para cada microplaca foram realizadas leituras avaliadas por parâmetro de leitura visual do crescimento microbiano. A análise foi realizada em duplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização Físico-química dos Óleos Essenciais

5.1.1 Cinética de Extração, Índice de Refração (IR), Teor de Umidade, Rendimento e Densidade

Algumas propriedades físicas dos óleos essenciais são importantes parâmetros a serem avaliados pois podem ser correlacionadas à qualidade química dos mesmos. A cinética de extração permite identificar o tempo ótimo de extração, visando a otimização do processo. Para a determinação da cinética de extração foi observada a variação do volume do óleo essencial extraído a cada 30 min, a 100 °C. O tempo máximo de extração para todas as espécies foi de 240 min, como mostra a **Figura 2**.

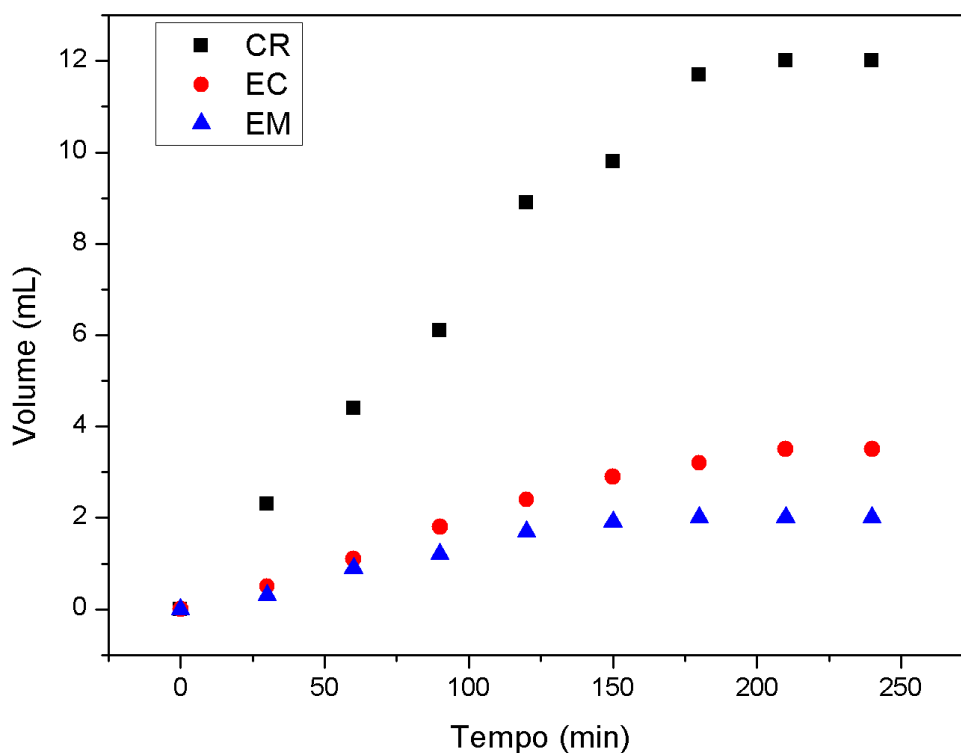


Figura 2. Cinética de extração dos óleos essenciais por hidrodestilação. CR = óleo essencial do cravo-da-Índia (*S.aromaticum*); EC = óleo essencial da erva cidreira (*L.alba*) e EM = óleo essencial da erva-de-marajó (*L. origanoides*).

Fonte: A autora (2019).

Após a finalização do processo de extração, os óleos foram coletados, desidratados em Na₂SO₄ anidro, centrifugados e armazenados em frascos de vidro do tipo âmbar a -20 °C.

Verificou-se que o processo de extração para o cravo-da-Índia (*S. aromaticum*) resultou no maior volume de óleo essencial (11 mL) em função do tempo quando comparado ao volume de óleo essencial extraído da erva-de-Marajó (*L. origanoides*), que apresentou menor volume extraído (2 mL) em função do tempo.

O índice de refração (IR) é um parâmetro físico-químico adimensional que permite avaliar a qualidade dos óleos essenciais e fixo. A densidade é outra forma de avaliação de qualidade. A umidade da biomassa é utilizada para a determinação da matéria seca, enquanto o rendimento de óleo extraído é um dos parâmetros para realizar a otimização de processos de extração. O rendimento do óleo extraído está diretamente relacionado a umidade, tendo em vista a utilização desta para o cálculo da quantidade de óleo extraído do material (seco – sem umidade ou fresco – com presença de umidade). Esses dados estão expostos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Valores do índice de refração, teor de umidade, rendimento e densidade dos óleos essenciais e fixo

Amostra	<i>L. alba</i>	<i>L. origanoides</i>	<i>D. odorata</i>	<i>S. aromaticum</i>
Índice de Refração	1,48	1,50	1,47	1,52
Teor de Umidade (%)	10,50	11,20	1,10	3,00
Rendimento (m/v)	1,55	2,21	3,90	4,60
Densidade (g/mL)	0,91	0,78	0,87	1,06

5.2 Caracterização Química dos óleos essenciais por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)

Os óleos essenciais da *L. origanoides*, *L. alba* e *S. aromaticum* foram analisados por CG/EM visando a identificação e quantificação de seus constituintes químicos. A **Tabela 2** mostra os constituintes químicos do óleo essencial da espécie *L. origanoides*.

Tabela 2: Constituintes químicos do óleo essencial da espécie *L. origanoides* obtidos por CG/EM

<i>L. origanoides</i>			
IR _{Cal}	IR _{Lit}	Substância	A (%)
1019	1022	o-cimeno	2,72
1024	1026	1,8 cineol	0,58
1050	1054	γ-terpineno	1,03
1099	1095	linalol	3,11
1095	1098	trans-hidrato sabineno	0,78
1288	1289	Timol	10,56
1297	1298	Carvacrol	67,22
1418	1417	E-cariofileno	5,31
1506	1509	α-thujaplicinol	4,65
1587	1583	óxido de cariofileno	2,77
Total			98,73

Foi possível verificar que os compostos Carvacrol, Timol e E-cariofileno são os constituintes majoritários presentes no óleo essencial da espécie *L. origanoides*, representando mais de 83% da constituição química total. Em (MAR et al., 2018b), os compostos fenólicos (timol e carvacrol) e o sesquiterpeno (E-cariofileno) também foram identificados em elevados percentuais. As atividades biológicas desta espécie são descritas em literatura como anti-inflamatória, antiplasmótica, analgésica, antifúngica e antibactericida, dentre outras. Tais efeitos são atribuídos à existência dos compostos supracitados (OLIVEIRA et al., 2014).

A **Tabela 3** apresenta os constituintes químicos presentes no óleo essencial da espécie *L. alba*. Esta espécie pode ser caracterizada em três quimiotipos. O quimiotipo I apresenta os constituintes citral e mirceno; o quimiotipo II apresenta os constituinte citral e limoneno; e o quimiotipo III é representado pela carvona e limoneno (TAVARES; MOMENTÉ; NASCIMENTO, 2011). Portanto, de acordo com os constituintes caracterizados, a *L. alba* deste estudo é do quimiotipo III, tendo a Carvona e o Limoneno como constituintes majoritários. Estudos de dois tipos de *L. alba* (OLIVEIRA et al., 2006) reportam sua importância na medicina tradicional pelas diversas atividades biológicas desta espécie, em seus diferentes quimiotipos. O efeito bactericida, fungicida e anti-inflamatório são atribuídos à presença da carvona e do limoneno.

Tabela 3: Constituintes químicos do óleo essencial da espécie *L. alba* obtidos por CG/EM

<i>L. alba</i>			
IR _{Cal}	IR _{Lit}	Substância	A (%)
976	974	β -pineno	2,73
1025	1024	Limoneno	18,35
1135	1139	hidrato pineno	0,45
1238	1239	Carvona	59,26
1289	1289	Timol	0,30
1351	1348	α -cubebeno	3,14
1384	1387	β -bourboneno	0,81
1387	1389	β -elemeno	0,42
1420	1417	<i>E</i> -cariofileno	4,85
1431	1430	β -copaeno	4,63
1435	1431	β -gurjuneno	0,56
1473	1478	γ -muuroleno	1,78
Total			97,28

A espécie *S. aromaticum* é uma das fontes vegetais mais ricas em compostos fenólicos (flavonóides, ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos) (CORTÉS-ROJAS; DE SOUZA; OLIVEIRA, 2014). Dentre eles, seu óleo essencial possui cerca de 75 a 90% de Eugenol, composto encontrado no material vegetal deste estudo, representando, juntamente com o constituinte eugenol acetato, aproximadamente 99% da constituição química do óleo essencial, como mostra a **Tabela 4**.

Tabela 4: Constituintes químicos do óleo essencial da espécie *S. aromaticum* obtidos por CG/EM

<i>S. aromaticum</i>			
IR _{Cal}	IR _{Lit}	Substância	A (%)
1357	1356	Eugenol	88,95
1523	1521	Eugenol acetato	10,6
Total			99,55

Investigações da ação do óleo essencial desta espécie contra micro-organismos patogênicos apontaram elevada atividade devido à alta concentração de Eugenol (SHARMA et al., 2017). Outras atividades, além da antimicrobiana, são atribuídas à presença de compostos fenólicos.

5.2.1 Caracterização Química do óleo vegetal de *D. odorata* por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O espectro de RMN de ^1H do óleo vegetal obtido das sementes da *D. odorata* apresentou perfil químico característico de sinais de triglicerídeos e ácidos graxos, o que confirma a característica oleaginosa das sementes (**Figura 3A**). A partir da ampliação do espectro de RMN ^1H da região dos sinais de hidrogênios olefínicos e aromáticos, é possível observar seis sinais referentes a seis hidrogênios, sendo dois dupletos em δ_{H} 7,71 e δ_{H} 6,43 com constante de acoplamento de 9,5 Hz característica de hidrogênios *cis*-olefínicos, e quatro sinais em δ_{H} 7,54 (m), δ_{H} 7,49 (dd, $J = 7,7:1,6$), δ_{H} 7,34 (d, $J = 8,3$) e δ_{H} 7,29 (dt, $J = 7,7:1,1$), referentes a hidrogênios aromáticos, como pode ser observado na **Figura 3B**.

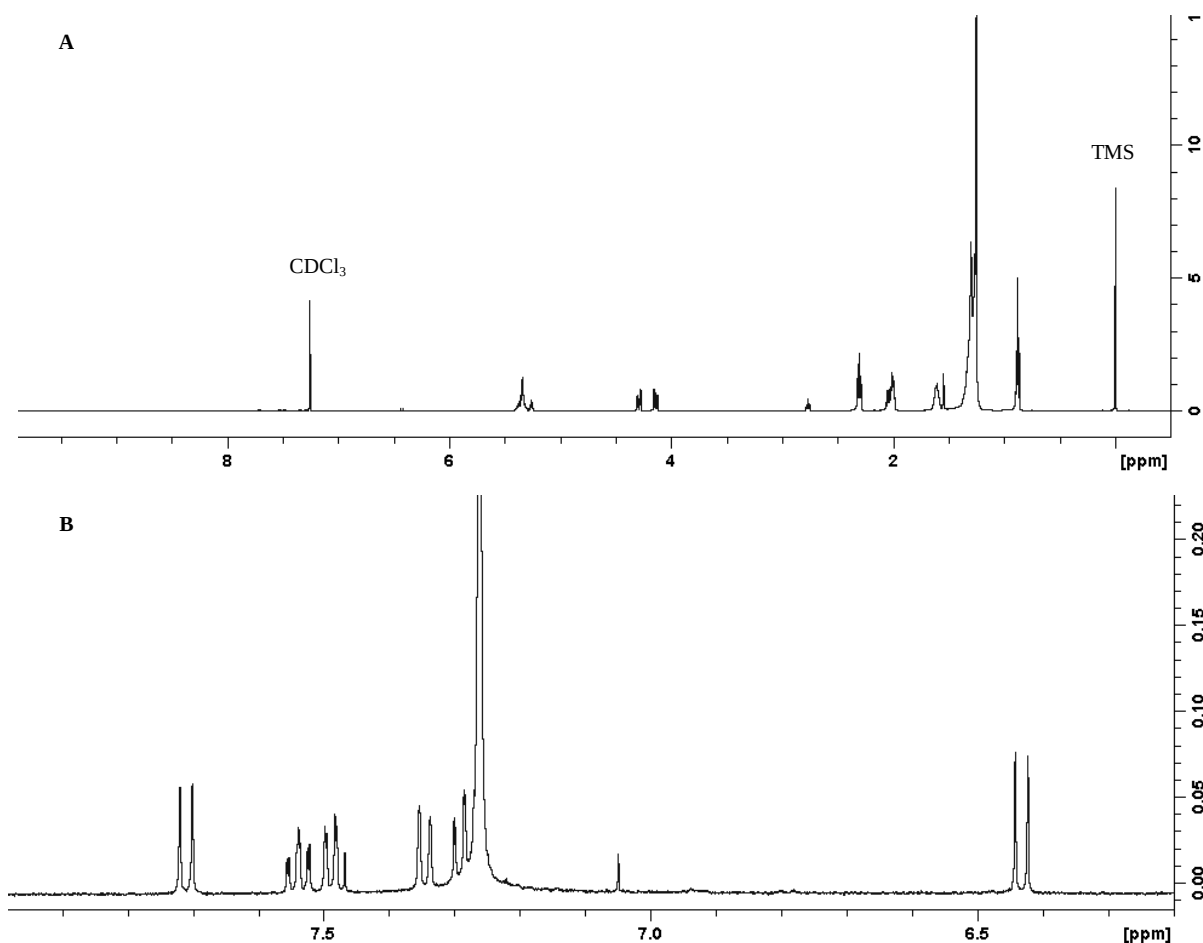


Figura 3: (A) Espectro de RMN ^1H (11,74 T, CDCl_3) do óleo das sementes da espécie *D. odorata* e (B) Ampliação da região olefínica e aromática.

O mapa de correlações HSQC evidenciou as ligações dos hidrogênios em δ_{H} 7,71 e δ_{H} 6,43 com os carbonos olefínicos em δ_{C} 143,4 e δ_{C} 116,8. Os hidrogênios

foram localizados em δ_H 7,54, δ_H 7,49, δ_H 7,34 e δ_H 7,29 com os átomos de carbono de anel aromático dissustituído δ_C 131,9, δ_C 127,9, δ_C 116,8 e δ_C 124,4, respectivamente (**Figura 4**).

Através do mapa de correlações HMBC (**Figura 5**) foram observadas correlações heteronucleares a longa distância dos átomos de hidrogênio em: δ_H 7,71 com os carbonos em δ_C 127,9 e δ_C 154,0; δ_H 6,43 com os carbonos em δ_C 118,9 e δ_C 160,4; δ_H 7,54, com os carbonos em δ_C 127,9 e δ_C 154,0; δ_H 7,49 com os carbonos em δ_C 131,9, δ_C 143,4 e δ_C 154,0; δ_H 7,34 com os carbonos em δ_C 124,4 e δ_C 154,0 e δ_H 7,29 com os carbonos em δ_C 116,8 e δ_C 118,9. Os dados de RMN 1D e 2D concordam com os sinais de esqueleto cumarínico (ALBARICI, T. R.; VIEIRA; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. G. F.; PIRANI, 2010). A estrutura identificada foi 2H-chromen-2-one, conhecida como cumarina (**Figura 6**).

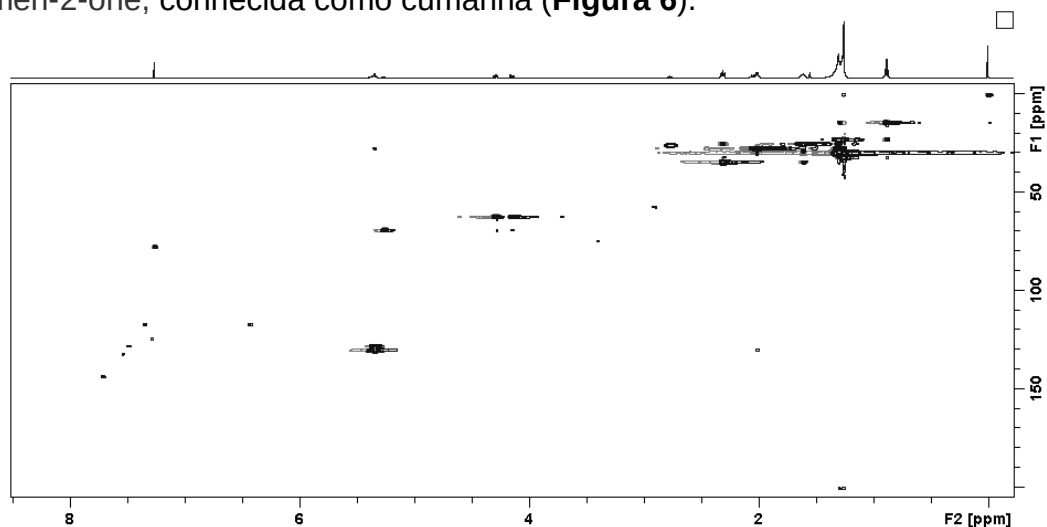


Figura 4: Mapa de correlações HSQC (11,74 T, $CDCl_3$) do óleo essencial das sementes da espécie *D. odorata*.

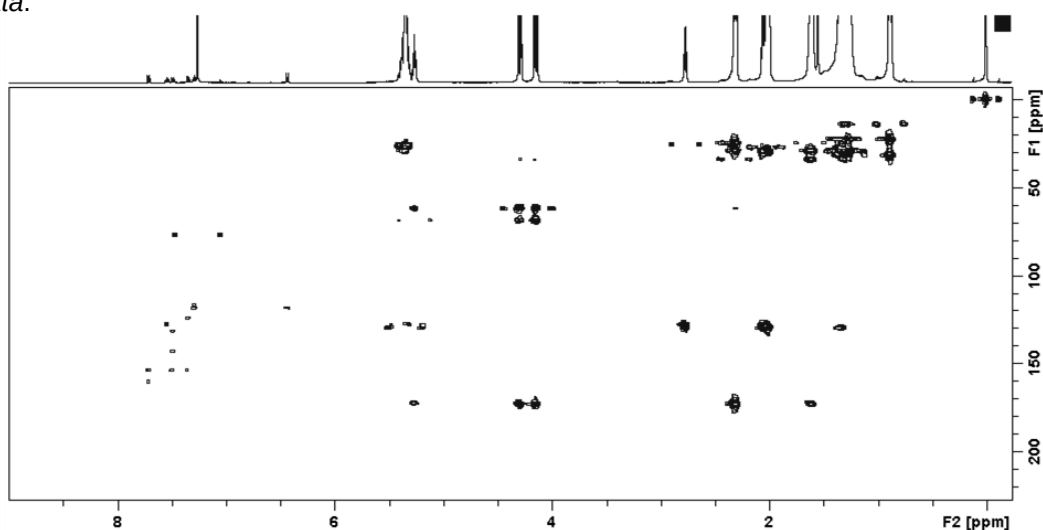


Figura 5: Mapa de correlações HMBC (11,74 T, $CDCl_3$) do óleo essencial das sementes da espécie *D. odorata*.

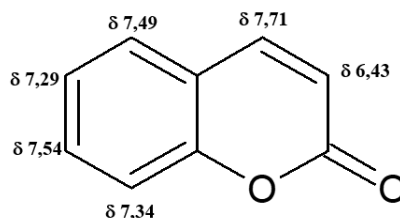


Figura 6: Estrutura molecular da Cumarina.

Fonte: A autora (2019)

5.3 Determinação de Fenóis Totais e Polifenoloxidase (PFO)

Os teores de fenóis totais dos óleos essenciais e fixo, e do padrão timol estão dispostos na **Tabela 5**. Os resultados estão expressos por equivalência a ácido gálico. A **Figura 7** mostra a curva de calibração de ácido gálico utilizado no ensaio de fenóis totais. O óleo essencial da *S. aromaticum* apresentou maior quantidade de compostos fenólicos, o que se pode atribuir à constituição química do óleo essencial, sendo possível verificar que o composto fenólico eugenol representa mais de 80% da constituição química do óleo *in natura*. Na sequência está o padrão timol e a espécie *L. origanoides*, que possui em sua constituição os compostos fenólicos timol e carvacrol (isômeros), representando mais de 77% da constituição total do óleo essencial.

Tabela 5: Teor de fenóis totais presentes determinado por equivalência a ácido gálico

Amostra	<i>L. alba</i> ± DP	<i>L. origanoides</i> ± DP	<i>D. odorata</i> ± DP	<i>S. aromaticum</i> ± DP	Timol ± DP
FT ± DP (mEAG/L)	23,4 ± 0,5	369,7 ± 0,8	5,0 ± 0,2	575,5 ± 0,6	446,4 ± 0,6

FT = Fenóis totais; DP = Desvio padrão; mEAG = miliequivalência a ácido gálico

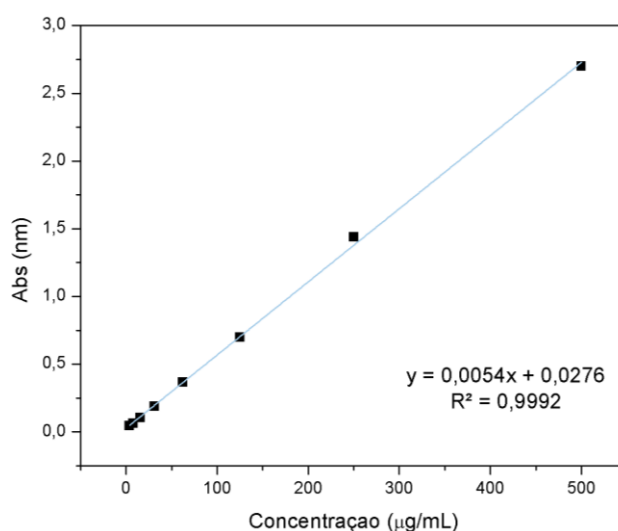


Figura 7: Curva de calibração de ácido gálico utilizada no ensaio de fenóis totais.

A presença de compostos fenólicos pode estar associada a diferentes atividades biológicas, como antioxidante (BURQUE, R. K.; FRANCESCONI, L. P.; VICTORINO, A. T.; MASCARENHAS, M. Á.; CERESÉR, 2015; MOREIRA et al., 2012), bactericida (BOUARAB-CHIBANE, L.; FORQUET, V.; CLEMENT, Y.; LANTERI, P.; BORDES, C.; BOUJILA, J.; DEGRAEVE, P.; OULAHAL, 2018; CASAGRANDE et al., 2018), inseticida (MAR et al., 2018b), fungicida (BOCQUET, L.; RIVIÈRE, C.; DERMONT, C.; SAMAILLIE, J. HILBERT, J-L.; HALAMA, P.; SIAH, A.; SAHPAZ, 2018; PATZKE; SCHIEBER, 2018), dentre outras.

Silva *et.al.*, (2018b) estudaram a ação antimicrobiana de vários polifenóis provenientes de duas espécies de plantas contra *S. enteritidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, e observaram a inibição dos micro-organismos para todas as espécies. Os autores concluíram que, quanto maior a quantidade de compostos fenólicos, maior a ação antimicrobiana, ou seja, a quantidade de fenóis pode estar diretamente relacionada ao efeito antimicrobiano.

Em outros estudos, independentemente do tipo de micro-organismo, seja bactéria Gram-negativa, Gram-positiva, levedura, bolores etc., esses micro-organismos apresentaram sensibilidade aos óleos de plantas que contém altos teores de compostos fenólicos em sua constituição química (LEYVA-JIMENEZ et al., 2019; MAHBOUBI et al., 2017). Os autores atribuíram a atividade antimicrobiana dos fenóis ao número de hidroxilas, grau de polimerização, adsorção em membrana celular e interações enzimáticas (KHORSHIDIAN et al., 2018; SILVA et al., 2018b), como é o caso da polifenoloxidase.

A atividade de polifenoloxidase está apresentada na **Tabela 6 e Figura 8**, em $\text{UE.s}^{-1}.\text{mL}^{-1}$. Dentre as espécies estudadas, destacam-se os óleos essenciais das espécies *S. aromaticum*, *L. alba*, além do padrão timol.

A polifenoloxidase é uma das enzimas responsáveis pela degradação de compostos fenólicos perto à alteração celular provocada por patógenos. Esta enzima é responsável, dentre outras reações, pela oxidação desses compostos, os quais são convertidos em quinonas (representada pelo aparecimento de substâncias de coloração escura), as quais são tóxicas aos patógenos (CAMPOS et al., 2004; DUANGMAL; OWUSU APENTEN, 1999; SANDRA CRISTINA et al., 2009). As modificações metabólicas representam fatores de inibição do crescimento do micro-organismos de ataque. Estudos relatam que a reação de oxidação de o-difenóis (ZHENG-CUIMING;

TENG-BING; GAO-FENGI; WUZONGPU; ZHENG-CM; TENG-B; GAO-FL; WU-ZP., 1999) e a catálise de *o*-hidoxilação de monofenóis (KUHN, 2007) em quinonas (através do processo enzimático PFO) ocorrem no primeiro estágio da infecção.

Tabela 6: Atividade enzimática polifenoloxidase (PFO)

Amostras	PFO	Coefficiente de determinação
<i>S. aromaticum</i>	$2,89 \times 10^{-05}$	$r^2 = 0,99$
<i>L. origanoides</i>	$2,36 \times 10^{-05}$	$r^2 = 0,99$
Timol	$2,28 \times 10^{-05}$	$r^2 = 0,98$
<i>L. alba</i>	$2,01 \times 10^{-05}$	$r^2 = 0,98$
<i>D. odorata</i>	$1,26 \times 10^{-05}$	$r^2 = 0,92$

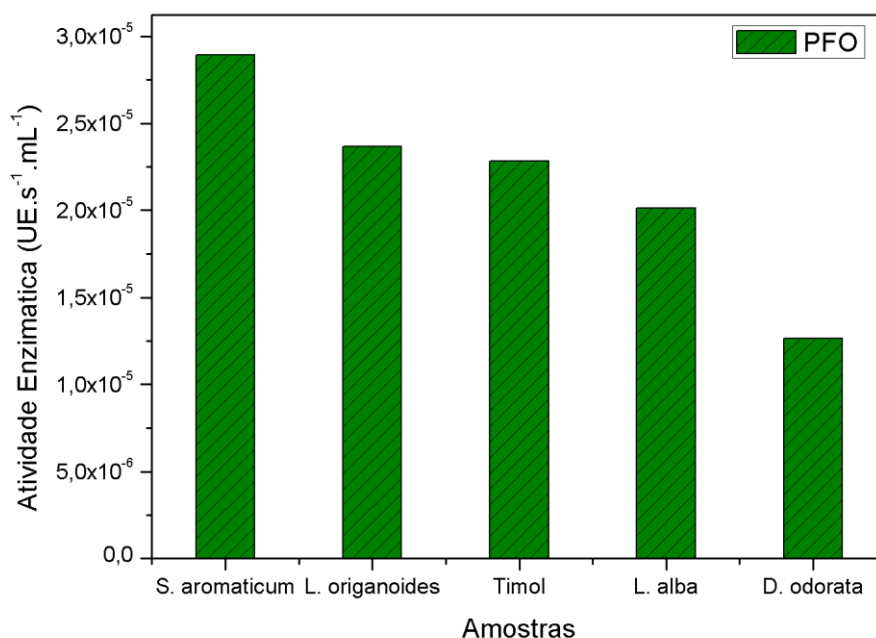


Figura 8: Atividade enzimática de polifenoloxidase dos óleos essenciais *L. alba*, *L. origanoides*, *S. aromaticum*, óleo vegetal de *D. odorata* e do padrão timol.

Os valores de atividade para a PFO podem ser atribuídos aos constituintes majoritários dos óleos essenciais e do padrão timol, que pertencem à classe de compostos fenólicos. O processo de ação contra os patógenos ocorre após a penetração

quando a enzima é liberada na ruptura da célula pelo processo de penetração, oxidando os fenóis e produzindo quinonas que apresentam ação antimicrobiana (THIPYAPONG; HUNT; STEFFENS, 2004).

5.4 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Os resultados obtidos no estudo da atividade antimicrobiana demonstrado através da formação de halos de inibição de crescimento microbiano estão apresentados na **Tabela 7** e ilustrados nas **Figuras 9-12**.

Dentre as espécies estudadas destaca-se o óleo essencial da *L. origanoides*, o qual apresentou atividade expressiva para *C. albicans*, *C. gatii* e *S. aureus*, resultando nos maiores halos de inibição. O óleo essencial da *S. aromaticum* apresentou a segunda melhor atividade dentre as substâncias testadas. O padrão timol e o óleo essencial da *L. alba* apresentaram baixa atividade quando comparados ao óleo essencial da *L. origanoides*. De todas as espécies testadas, o óleo da *D. odorata* não apresentou atividade contra nenhum dos micro-organismos testados.

Tabela 7: Valores dos halos de inibição dos óleos essenciais, óleo fixo e do padrão timol frente aos micro-organismos testados

Micro-organismos	Óleos Essenciais, Óleo Fixo e Padrão				
	<i>L. alba</i>	<i>L. origanoides</i>	<i>D. odorata</i>	<i>S. aromaticum</i>	Timol
<i>A. fumigatus</i> CFAM 1490	s/a	s/a	s/a	s/a	s/a
<i>C. albicans</i> CFAM/ILMD-FIOCRUZ	9,0	42,0	s/a	30,0	11,0
<i>C. gatii</i> AC	13,0	45,0	s/a	40,0	13,0
<i>S. aureus</i> CBAM 629	8,0	35,0	s/a	15,0	8,0

Valores expressos em milímetros (mm); s/a = sem atividade; AC = amostra clínica.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial da espécie *L. origanoides* também foi relatada por (OLIVEIRA et al., 2014). Os autores atribuíram a diversificada atividade biológica desta espécie aos constituintes Carvacrol e Timol, os quais estão presentes em maiores quantidades nas folhas. Atividades antibactericida e antifúngica

de outras espécies de *Lippia* também são reportadas em literatura, além de apresentarem compostos fenólicos em sua composição química (DE ALMEIDA et al., 2018).

Para o fungo *A. fumigatus*, nenhuma das substâncias testadas (óleos essenciais, óleo vegetal e padrão sintético) apresentaram atividade contra esta espécie de fungo filamentoso. Porém, pode-se observar que o óleo essencial da espécie *L. origanoides* diminuiu a formação da esporulação do fungo *A. fumigatus*. O óleo essencial de *S. aromaticum* e o padrão timol também proporcionaram a diminuição do esporo, contudo, em menor proporção quando comparado com *L. origanoides*.

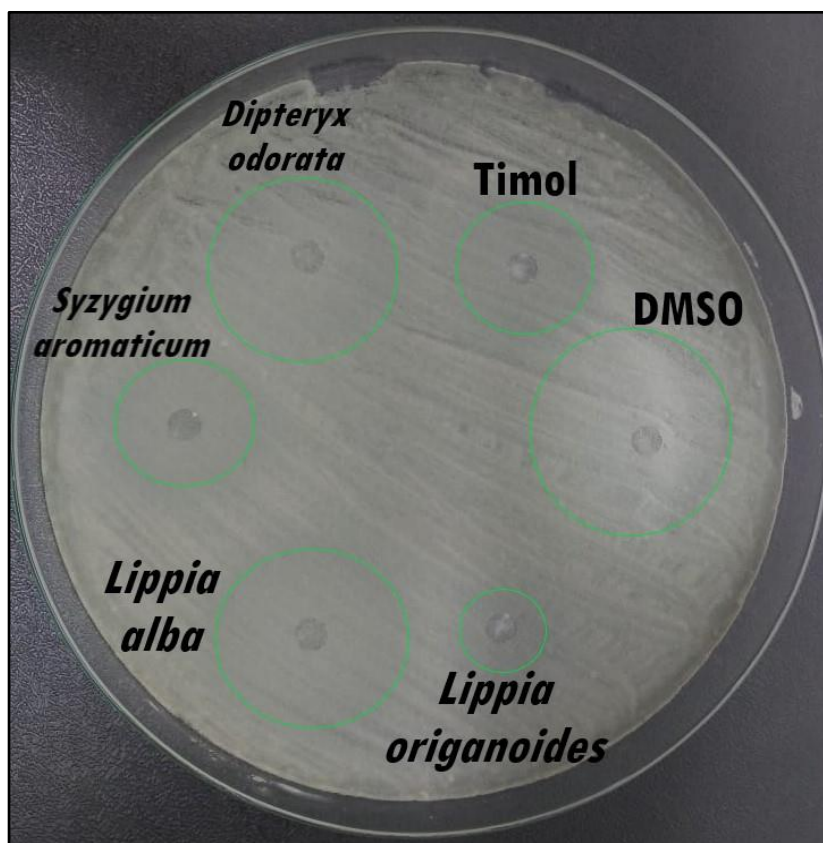


Figura 9: Placa do ensaio com *A. fumigatus* CFAM 1490. Os círculos delimitam visualmente maior esporulação do fungo.
Fonte: A autora (2019).

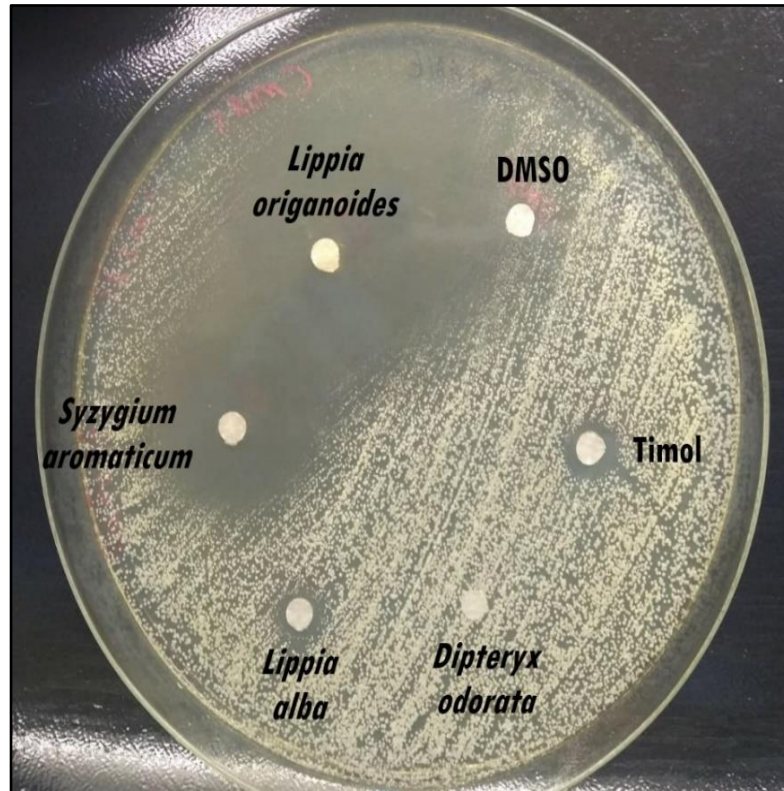


Figura 10: Placa do ensaio com *C. albicans* CFAM/ILMD-FIOCRUZ.
Fonte: A autora (2019).

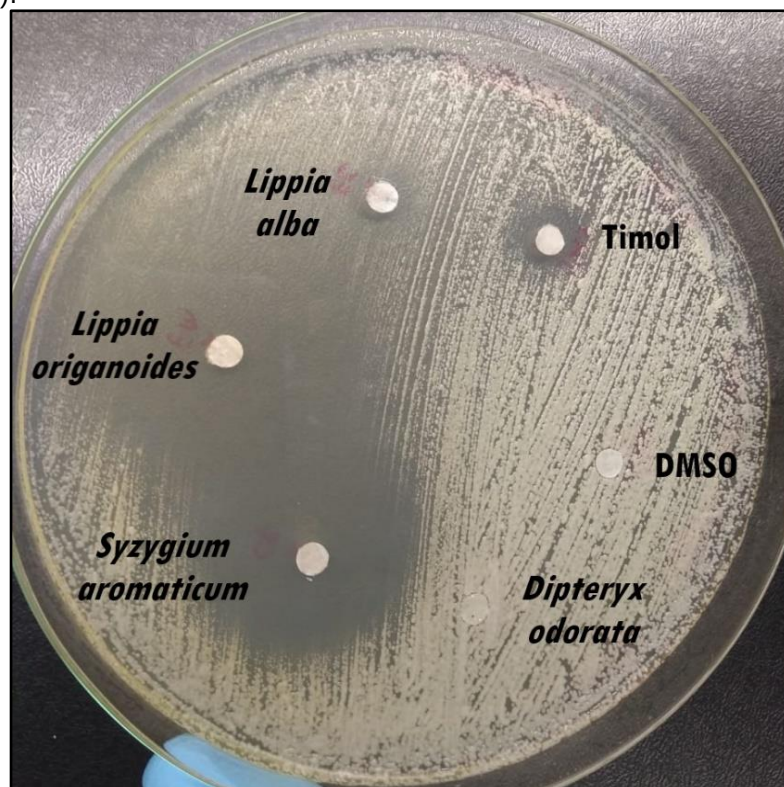


Figura 11: Placa do ensaio com *C. gattii* Amostra clínica.
Fonte: A autora (2019).

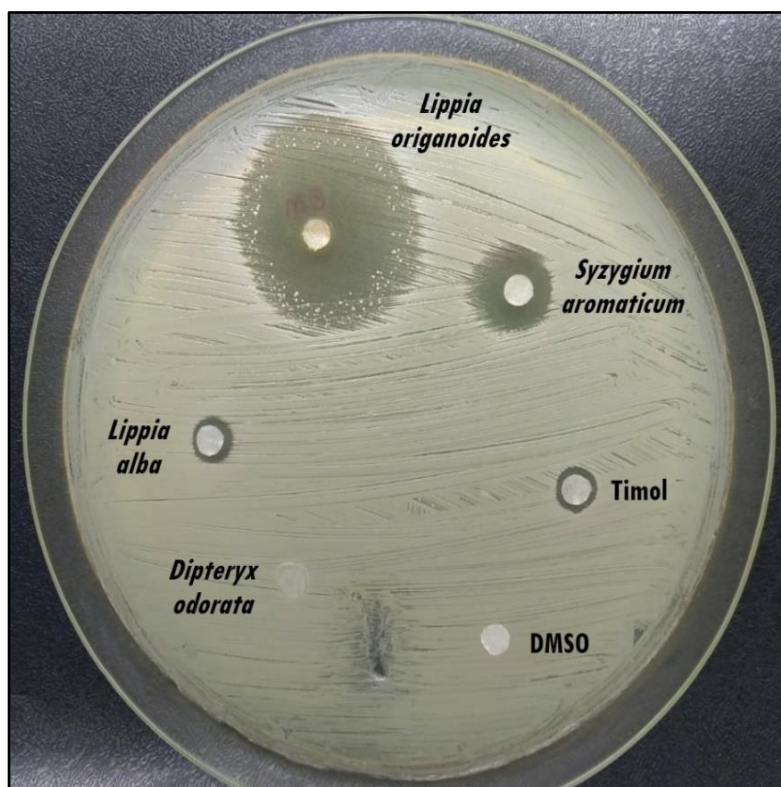


Figura 12: Placa do ensaio com *S. aureus* CBAM 629.
Fonte: A autora (2019).

Foi possível verificar a atividade fungicida e bactericida do óleo essencial da espécie *S. aromaticum* nos testes com as espécies de patógenos estudadas. A atividade deste óleo essencial pode ser atribuída ao constituinte majoritário Eugenol. Este composto é descrito como ativo contra fungos e bactérias, tendo sua ação antimicrobiana, juntamente com outros compostos como timol e carvacrol, reportados por (MEDEIROS et al., 2016). Em fungos, o processo de ação do óleo essencial da espécie *S. aromaticum* pode ocorrer pela inibição total do crescimento de micélios e esporos (SHARMA et al., 2017). Assim como observado no presente estudo, a ação deste óleo essencial contra a bactéria *S. aureus* também foi reportada por (PANAHI et al., 2014).

Além dos micro-organismos testados acima, foram realizados ensaios com os dermatófitos *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton tonsurans*, além da *Candida parapsilosis* porém pela metodologia de microdiluição descrita a seguir.

5.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

De acordo com o ensaio de atividade antimicrobiana, os óleos essenciais que apresentaram maior atividade (*L. origanoides* e *S. aromaticum*) foram selecionados para o ensaio de concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição em poço. Os valores da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais estão expressos nas **Tabelas 8 e 9**.

Tabela 8: Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais das espécies *S. aromaticum* e *L. origanoides* frente as leveduras

Óleos	<i>C. albicans</i> CFAM/ILMD	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. gattii</i> AC	<i>C. gattii</i> VGII CFP 60
<i>S. aromaticum</i>	2,65	2,65	1,32	1,32
<i>L. origanoides</i>	1,95	1,95	0,97	0,97

Concentração de óleo essencial expressa em mg/mL; AC = amostra clínica.

Tabela 9: Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais das espécies *S. aromaticum* e *L. origanoides* frente aos dermatófitos

Óleos	<i>M. canis</i> AC	<i>T. mentagrophytes</i> AC	<i>T. rubrum</i> AC	<i>T. tonsurans</i> AC
<i>S. aromaticum</i>	1,98	0,33	0,33	0,66
<i>L. origanoides</i>	3,9	0,24	0,24	0,73

Concentração de óleo essencial expressa em mg/mL; AC = amostra clínica.

O óleo essencial da espécie *S. aromaticum* apresentou atividade antifúngica para todos as espécies fúngicas testadas, variando de 0,33 a 2,65 mg/mL. Esses dados são corroborados por alguns trabalhos existentes na literatura, como o descrito por (MARIATH, I. R., LIMA, I. O., 2006; SARTO, M. M.; ZANUSSO JUNIOR, 2014), que reportam a ação antifúngica do óleo essencial da *S. aromaticum* e também do Eugenol (composto majoritário deste óleo essencial) para espécies dos gêneros *Candida* e *Trichophyton*, atribuindo o potencial antifúngico à presença do Eugenol.

A atividade antifúngica do óleo essencial da espécie *L. origanoides* frente a dermatófitos (*Microsporum* e *Trichophyton*) foi relatada por (FARIA MAIA; DE

DONATO; ELIAS FRAGA, 2015), que atribuiu a ação fungicida às substâncias presentes na composição química dos óleos essenciais como, por exemplo, fenólicos e terpenóides, que causam efeitos tóxicos na função celular. Os autores reportam, ainda, a ação sinérgica entre óleos essenciais e antimicrobianos comerciais.

Considerando a bactéria *S. aureus*, a CIM do óleo essencial da espécie *S. aromaticum* foi de 2,65 mg/mL, enquanto que o CIM do óleo essencial da espécie *L. origanoides* foi de 0,97 mg/mL. De acordo com os resultados obtidos, pode-se destacar que o óleo essencial que apresentou maior atividade frente a esta bactéria foi o da espécie *L. origanoides*. Estudos reportados por (DA SILVA et al., 2015), também mostram a baixa ação antimicrobiana do óleo essencial da *S. aromaticum* frente a bactéria *S. aureus* e *E. coli*. No estudo de (ALMEIDA, A. C.; OLIVEIRA, L.; PAULO, P. D.; MARTINS, E. R.; SOUZA, R. M.; FIGUEIREDO, L. S.; SANTOS, C. A.; FONSECA, 2013), o óleo essencial da *S. aromaticum* apresentou atividade frente a bactéria *S. aureus*, com concentração de 400 µL/g, concentração superior a utilizada no presente trabalho. O autor atribuiu este efeito à permeação do óleo essencial na parede celular do micro-organismo, causando danos e degradação celular.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial da *L. origanoides* foi reportada em uma revisão bibliográfica sobre a atividade antifúngica e antibacteriana do gênero *Lippia*, e a atividade antibacteriana da espécie *L. origanoides* frente a *S. aureus*. Em (COSTA et al., 2017; SOUZA; ALMEIDA; MARTINS, 2017), a ação antibacteriana frente às cepas da *S. aureus* foi atribuída à presença de compostos fenólicos, tais como Timol, Carvacrol e Eugenol. O mecanismo de ação desses compostos ainda não foi totalmente elucidado, porém, o que se observa são danos na estrutura celular da membrana.

CAPÍTULO II

6. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

6.1 Gomas, Isolados Proteicos de Soro (IPS) como Materiais Encapsulantes

A técnica de encapsulação de substâncias ativas representa uma importante ferramenta para a proteção dessas substâncias por um material de parede, e sua liberação acontece segundo condições específicas. A encapsulação vem sendo amplamente utilizada para a proteção de óleos essenciais, uma vez que estes ativos naturais estão susceptíveis à volatilização e oxidação em condições ambientes. No entanto, esta técnica pode ser utilizada para proteger qualquer tipo de substância, líquidos, gases ou sólidos. O desenvolvimento dessas nano/micropartículas encapsulantes envolve uma série de parâmetros relacionados com as finalidades específicas de ação das substâncias encapsuladas, e também dos mecanismos de liberação controlada, os quais muitas vezes podem estar relacionados ao tipo de material de parede utilizado no desenvolvimento dessas partículas (PINHEIRO ALVES et al., 2014; SILVA et al., 2018a).

As propriedades dos agentes encapsulantes são parâmetros necessários a serem analisados em processos de encapsulação pois interferem na eficiência de encapsulamento, estabilidade, funcionalidade e morfologia das micro/nanopartículas. Dentro deste contexto, foram selecionados para esta pesquisa três tipos de materiais de parede: as **Gomas** e os **Isolados Proteicos de Soro (IPS)**. Esses materiais foram escolhidos por apresentarem características químicas bastante distintas, além de serem reportados em literatura como eficientes materiais de parede (CAMPELO-FELIX et al., 2017; CAMPELO et al., 2018).

Os materiais de parede são assim chamados pois constituem a camada protetora do ativo encapsulado, criando uma barreira para o meio externo, como mostra a **Figura 13**. O desenvolvimento de nano/micropartículas encapsulantes pode ser tão complexo quanto as finalidades desejadas na liberação controlada, podendo envolver uma série de parâmetros a serem avaliados em conjunto e que resultam no desenvolvimento final de uma partícula encapsulante específica.

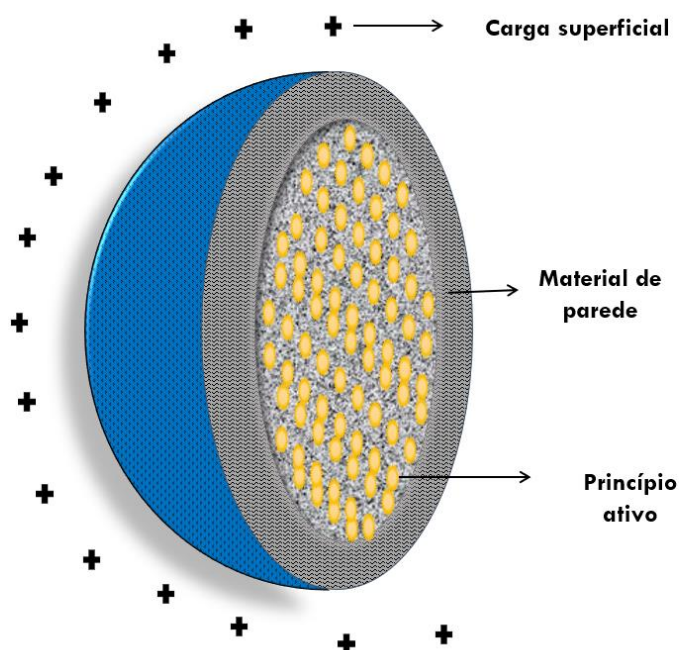


Figura 13: Encapsulação de uma substância ativa (princípio ativo) em um material de parede hipotético. Os sinais (+) representam as cargas (hipotéticas) externas da partícula, relacionadas à estabilidade do sistema.

Fonte: A autora (2019).

Os materiais de parede devem ser selecionados apropriadamente de acordo com as necessidades de liberação controlada do ativo, tais como o pH do meio de liberação, higroscopicidade, hidrosolubilidade, espessura da camada externa, número de camadas, mecanismo de liberação desejado, tempo desejado para a liberação do ativo, além da sua interação com o meio externo. Ou seja, é necessária a investigação de uma série de parâmetros para que a(s) camada(s) externa(s) das partículas encapsulantes seja(m) desenvolvida(s) segundo necessidades específicas.

6.2 Gomas (Arábica, Carragena e Xantana)

A **Gomas** são polissacarídeos, obtidos de fontes como algas, plantas e micro-organismos. São consideradas bons materiais encapsulantes devido suas propriedades: Estabilizantes de emulsões, espessantes, geleificantes e etc. A **Goma Arábica**, sendo exsudado da Acacia Senegal e outras espécies da família Leguminosae, é um polissacarídeo ácido que apresenta estrutura com ramificações. A cadeia principal é constituída por unidades de D-galactopiranosose com ligações glicosídicas β -D- (1-3). As cadeias laterais, apresentam cadeias com D-galactopiranosose, L-ramnose e ácido

glucorônico com ligações β (1-6) (BARRETO, A. R.; RAMÍREZ-MÉRIDA, L. G.; ETCHEPARE, M. A.; JACOB-LOPES, E.; MENEZES, 2015a).

Segundo (BARRETO, A. R.; RAMÍREZ-MÉRIDA, L. G.; ETCHEPARE, M. A.; JACOB-LOPES, E.; MENEZES, 2015b) e colaboradores, decrevem as gomas Carragena e Xantana como: **Goma Carragena**, sendo um polissacarídeo obtido de algas vermelhas da classe das Rhodophyceae. Apresenta os tipos o Kappa (κ), Iota (ι) e Lambda (λ); sua estrutura primária linear é formada por unidades alternadas de D-galactose e 3,6-anidro-D-galactose (3,6AG) com diferentes graus de sulfatação, unidas por ligações glicosídicas alternadas α - (1,3) e β - (1,4); E a **Goma Xantana** como um heteropolissacarídeo produzido pela *Xanthomonas campestris*, apresenta estrutura química matriz celulósica (ligação β -1,4) substituída por resíduos de glucose, com cadeia lateral alternada por trissacarídeos.

6.3 Isolados Proteicos de Soro (IPS)

Os **Isolados Proteicos de Soro (IPS)** são comumente utilizados como materiais de parede devido às suas propriedades emulsificantes (FERNANDES, 2013). Os IPS se apresentam como os principais materiais encapsulantes de fontes proteicas, que auxiliam na proteção dos ativos encapsulados. A **Figura 14** mostra a representação das proteínas que apresentam maior porcentagem na composição dos IPS.

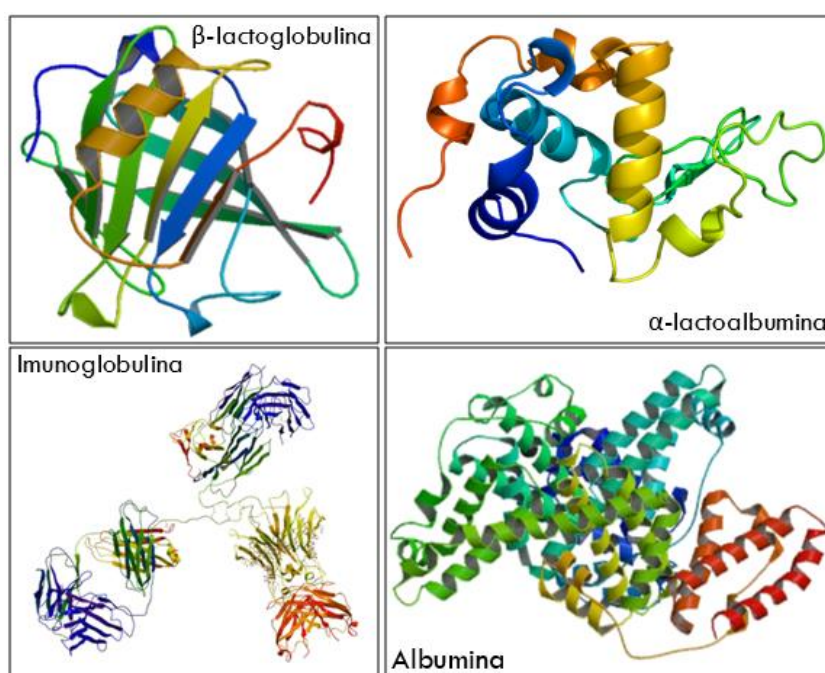


Figura 14: Representação das proteínas que apresentam maior porcentagem na composição dos Isolados do soro do leite.

Fonte: A autora (2019).

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Síntese de Micropartículas contendo os Ativos Encapsulados

Para a realização da síntese de micropartículas encapsulantes foi realizado um ensaio preliminar para a determinação do material de parede apropriado para a formação das micropartículas, visando estabilidade para o processo de síntese e para os ativos encapsulados. Os materiais que apresentaram melhor estabilidade foram selecionados para o prosseguimento do estudo.

Foram selecionados para este ensaio 3 tipos de gomas e 3 tipos de IPS. São eles: Goma Arábica (GA), Goma Carragena (GC) e Goma Xantana (GX); Isolado do Soro (WPI), Isolado do Soro Concentrado (WPC) e Isolado do Soro Hidrolisado (WPH). A metodologia utilizada neste trabalho é baseada em (AZEREDO, 2005; COSTA, 2013; FRASCARELI, 2010) com adaptações. Foram adicionados os materiais de parede solubilizados em água e deixados em repouso por 12 h para a melhor hidratação. As emulsões foram preparadas com 20% de material de parede, 75% de água destilada, 4,8% de óleo mineral e 0,20% de ativo (óleo essencial, fixo ou padrão timol). Após a mistura, as emulsões foram submetidas a homogeneização em agitador mecânico ultra Turrax Gehaka (modelo ULTRA DU-15) por 10 min, na velocidade 18.000 rpm para evitar formação de excesso de espuma. As emulsões de IPS foram submetidas a secagem por liofilização em Liofilizador Terroni, modelo Enterprise I, por 24h.

7.2 Teor de Umidade

O teor de umidade foi determinado para o material vegetal de cada espécie, sendo avaliado nas folhas de *L. alba* e *L. organoides*, na semente de *D. odorata* e no broto de flor de *S. aromaticum*. As micropartículas encapsulantes constituídas de IPS na forma de pó também tiveram seu teor de Umidade avaliado. A análise foi realizada em um equipamento analisador de umidade da marca BEL ENGINEERING® (modelo i-Thermo 163L, Italy) a 105 °C. A programação das medidas foi realizada segundo a norma ABNT (NBR 9656).

7.3 Molhabilidade dos Sistemas de IPS

A molhabilidade dos encapsulados de IPS produzidos a partir de diferentes materiais de parede foi avaliada pelo método descrito por (FUCHS, M.; TURCHIULI, C.; BOHIN, M.; CUVELIER, M. E.; ORDONNAUD, PEYRAT-MAILLARD, M. N.; DUMOULIN, 2006). Foi adicionado 0,5 g dos sistemas de IPS sobre a superfície de 50 mL de água destilada a 25°C, sem agitação. Com o auxílio de um cronômetro digital foi determinado o tempo necessário para as partículas sedimentarem.

7.4 Medida de Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR

As análises para determinação de grupos funcionais orgânicos e caracterização orgânica das amostras foram realizadas em espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier da marca Shimadzu e modelo IR Prestige-21 com software IRsolution versão 1.6. Para a confecção da pastilha base e análise de background ou branco, foram pesados 170 mg de brometo de potássio (KBr) e logo após realizada a maceração em almofariz com auxílio de pistilo, em seguida foi realizada a prensagem durante 10 minutos a pressão de 80 kPa. O procedimento para a confecção de pastilha é semelhante ao realizado com a pastilha de background ou branco, foram adicionados 30 mg da amostra juntamente ao brometo de potássio e realizada a maceração, posteriormente feita a prensagem por 10 minutos sob 80 kPa de pressão resultando em pastilha pronta para análise. Os parâmetros utilizados nas análises estão descritos na **Quadro 2**.

Quadro 2: Parâmetros utilizados nas análises de FTIR

Modo	Transmitância
Apodização	Happ-Genzel
Número de scans	64
Resolução	1,0
Range de Varredura	
Máximo	4000 (cm ⁻¹)
Mínimo	500 (cm ⁻¹)

As medidas foram realizadas no Laboratório ILUM - Desenvolvimento e Inovação, do HUB Tecnologia e Inovação, situado na Universidade Estadual do Amazonas - UEA.

7.5 Eficiência de Encapsulação (EE)

A determinação da eficiência de encapsulação (EE) das partículas proteicas foi avaliada através do método descrito por (BAE, E. K.; LEE, 2008). Foram adicionados 2,0 g de pó em 20 mL de hexano (C_6H_{14}) em um frasco de vidro com tampa, onde serão submetidos a agitação em vórtex por 2 min em temperatura ambiente. A mistura do solvente foi filtrada e o pó coletado no filtro foi submetido a lavagem em duplicata com 20 mL de hexano. Em seguida, foi realizada a evaporação do solvente em estufa a 60 °C até a obtenção de massa constante.

A quantidade de óleo livre do sistema foi calculada a partir da Eq. 1:

$$EE_{\%} = \frac{OT - OL}{OT} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

onde EE é a eficiência de encapsulação, em %; OT é a quantidade de óleo total e OL é a quantidade de óleo livre nos sistemas.

8. RESULTADOS E DISCUSSÕES

8.1 Micropartículas Proteicas

O ensaio preliminar para a escolha dos materiais de parede mais apropriados para o encapsulamento dos ativos foi realizado com primeiramente com três tipos de Goma (Arábica, Carragena e Xantana), e três Isolados Proteicos de Soro (Isolado do Soro de Leite – WPI, Isolado Concentrado de Leite – WPC e Isolado Hidrolisado de Leite – WPH), como mostra a **Figura 15**.

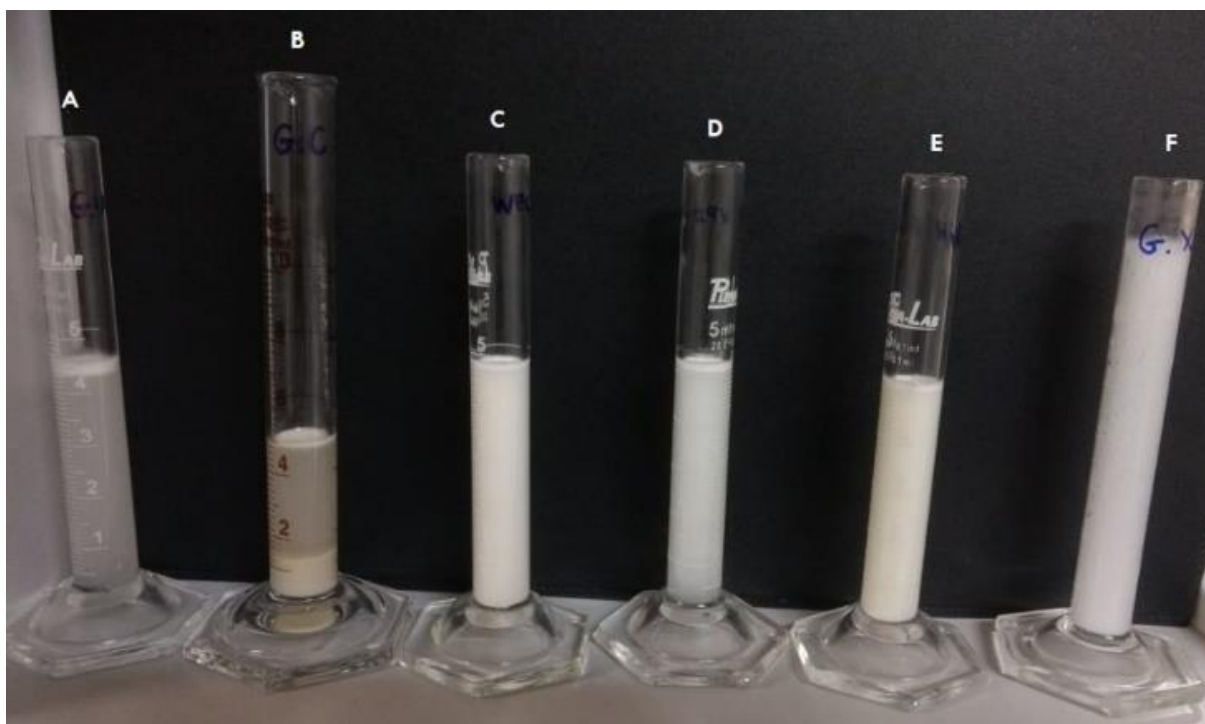


Figura 15: Testes preliminares com diferentes materiais encapsulantes: (A) Goma Arábica, (B) Goma Carragena, (C) Isolado Concentrado de Leite – WPC, (D) Isolado do Soro de Leite – WPI, (E) Isolado Hidrolisado de Leite – WPH e (F) Goma Xantana.

Neste ensaio foi selecionado o óleo essencial da espécie *S. aromaticum* para a síntese das emulsões com os diferentes materiais de parede afim de avaliar preliminarmente a estabilidade dos sistemas. As emulsões contendo as Gomas Arábica e Carragena apresentaram menor estabilidade, verificada pela separação de fases em maior proporção, como mostra a **Figura 15 (A) e (B)**. O uso da Goma Xantana, **Figura 15 (F)**, proporcionou a formação de um gel extremamente viscoso devido ao seu elevado grau de higroscopicidade, solidificando o sistema e impedindo sua homogeneização pelo dispersor Ultraturrax, resultando na baixa encapsulação do óleo essencial e na formação de uma fase contendo óleo essencial não encapsulado verificada acima do gel.

As emulsões contendo os materiais de parede proteicos de Isolado do Soro de Leite – WPI (**Figura 16(A)**), Isolado Concentrado – WPC (**Figura 16(B)**) e Hidrolisado de Leite – WPH (**Figura 16(C)**), apresentaram a melhor estabilidade, não apresentando separação de fases em tempo superior a 24 h, tempo suficiente para que as emulsões sejam submetidas ao processo de secagem.

Esta etapa tornou-se necessária para a garantia de que o ativo encapsulado esteja protegido pelo material de parede durante toda a etapa de secagem da emulsão, restando a substância ativa no núcleo e evitando ou diminuindo a separação de fases. As emulsões são suscetíveis não somente à separação de fase como também à floculação, cremação, sedimentação, coalescência, dentre outros fenômenos. Estes estados de instabilidade ocorrem devido à tendência natural das emulsões de retornarem ao seu estado inicial de mínima energia, o que acarreta na diminuição da área de contato interfacial (LI; ROOS; MIAO, 2017; PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015).

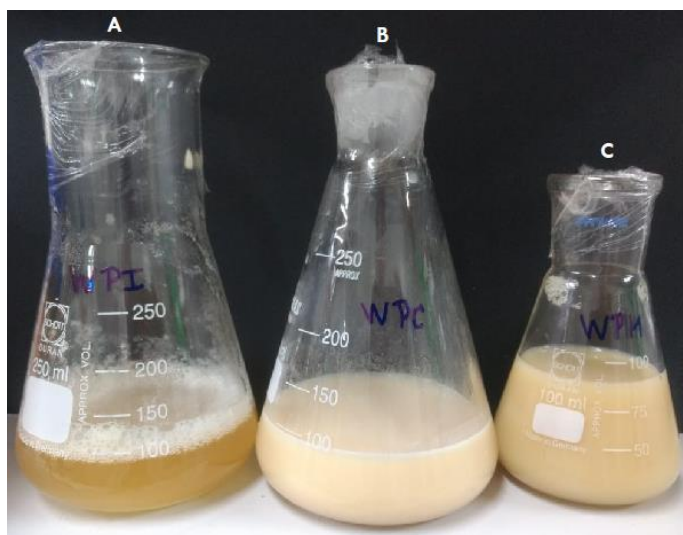


Figura 16: (A) Emulsões de Isolado de Soro de Leite – WPI, (B) Isolado Concentrado de Leite – WPC e (C) Isolado Hidrolisado de Leite – WPH.
Fonte: A autora (2019)

Por fim, nas emulsões contendo os três isolados de leite foram incorporados os óleos essenciais e o padrão timol (na concentração de 1 mg/mL) e, em seguida, os sistemas foram submetidos à etapa de secagem por liofilização, obtendo-se os microencapsulados na forma de pó para cada sistema. A **Figura 17** mostra a imagem do microencapsulado em pó obtido a partir do Isolado de Soro de Leite - WPI liofilizado.



Figura 17: Imagem do microencapsulado em pó obtido a partir do Isolado Proteico de Soro – IPS liofilizado.

Fonte: A autora (2019)

8.2 Teor de Umidade das Micropartículas Proteicas

As amostras microencapsuladas desenvolvidas a partir dos isolados de leite apresentaram teor de umidade inferior a 4%, como pode ser observado na **Tabela 10**. Este baixo teor pode ser explicado devido ao processo de secagem por liofilização, técnica de desidratação que visa manter a integridade funcional do produto, apresentando maior eficiência de secagem quando comparada aos métodos convencionais, como relatado por (ALVES, C. C. OL.; RESENDE, J. V.; CRUVINEL, R. S. R.; PRADO, 2008). Dentre os três isolados, o que apresentou maior percentual de umidade foram os sistemas contendo como material de parede o Isolado de Soro de Leite – WPI, apresentando valor de 3,75% para o sistema contendo o óleo essencial da *L. origanoides*.

Tabela 10: Teor de umidade dos sistemas de Isolados de Soro de Leite (WPI, WPC e WPH) contendo os óleos e o padrão microencapsulados

Amostra	Umidade (%) $\pm$ DP
WPI/EM	3,75 $\pm$ 0,04
WPI/CR	1,30 $\pm$ 0,01
WPC/EM	1,19 $\pm$ 0,01
WPC/CR	1,28 $\pm$ 0,01
WPH/EM	1,59 $\pm$ 0,01
WPH/CR	1,78 $\pm$ 0,02

DP = desvio padrão; WPI = Isolado de Soro de Leite; WPC = Isolado Concentrado de Leite; WPH = Isolado Hidrolisado de Leite; EM = óleo essencial da erva-de-Marajó (*Lippia origanoides*); CR = óleo essencial do carvo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*).

A avaliação do teor de umidade torna-se um parâmetro importante a ser avaliado pois sua presença propicia um ambiente favorável para o crescimento microbiano, alterando as características físicas dos sistemas encapsulados, tornando o pó com aspecto glutinoso e diminuindo o tempo de estabilidade. O baixo teor de umidade das microcápsulas relaciona-se com a qualidade e a manutenção estrutural do pó. A secagem das microcápsulas pode aumentar sua durabilidade, estocagem e facilidade no manuseio (MUKAI-CORREA et al., 2005).

8.3 Teor de Óleo Superficial e Eficiência de Encapsulação das Micropartículas Proteicas

Os valores de EE e de teor de óleo superficial das micropartículas proteicas contendo os óleos essenciais da *S. aromaticum* e *L. organoides* estão dispostos na **Tabela 11**.

Tabela 11: Eficiência de Encapsulação (EE), Teor de Óleo Superficial (OS) e Retenção de Óleo das micropartículas proteicas contendo os óleos essenciais das espécies *S. aromaticum* e *L. organoides*

Amostra	Teor de OS (g) $\pm$ DP	EE (%) $\pm$ DP	Teor de Retenção $\pm$ DP
WPI/EM	0,173 $\pm$ < 0,01	98,2 $\pm$ < 0,01	10,17 $\pm$ < 0,01
WPI/CR	0,161 $\pm$ < 0,01	98,3 $\pm$ < 0,01	10,16 $\pm$ < 0,01
WPC/EM	0,185 $\pm$ < 0,01	98,1 $\pm$ < 0,01	10,18 $\pm$ < 0,01
WPC/CR	0,198 $\pm$ < 0,01	98,0 $\pm$ < 0,01	10,20 $\pm$ < 0,01
WPH/EM	0,188 $\pm$ < 0,01	98,1 $\pm$ < 0,01	10,19 $\pm$ < 0,01
WPH/CR	0,191 $\pm$ 0,01	98,0 $\pm$ 0,01	10,19 $\pm$ 0,01

DP = desvio padrão; WPI = Isolado de Soro de leite; WPC = Isolado Concentrado de Leite; WPH = Isolado Hidrolisado de Leite; EM = óleo essencial da erva-de-Marajó (*L. organoides*); CR = óleo essencial do cravo-da-Índia (*S. aromaticum*).

Para todos os sistemas foram obtidos elevados valores de EE, o que demonstra que o método de homogeneização e secagem por liofilização foram eficientes para a proteção dos materiais bioativos, além da confirmação de que os materiais de parede foram selecionados adequadamente. Esse fato implica diretamente na quantidade de óleo superficial nos sistemas, pois quanto menor o teor de óleo superficial, ou seja, óleo livre não encapsulado, maior a EE.

Dessa forma, foi constatado que os materiais de parede baseados em partículas proteicas proporcionam maior viabilidade de produção devido ao método de liofilização contribuir para a EE, obtida acima de 98%.

8.4 Análise por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR das micropartículas contendo os óleos essenciais das espécies *S. aromaticum* e *L. origanoides* encapsulados nos materiais proteicos WPI, WPC e WPH estão dispostos na **Figura 18**.

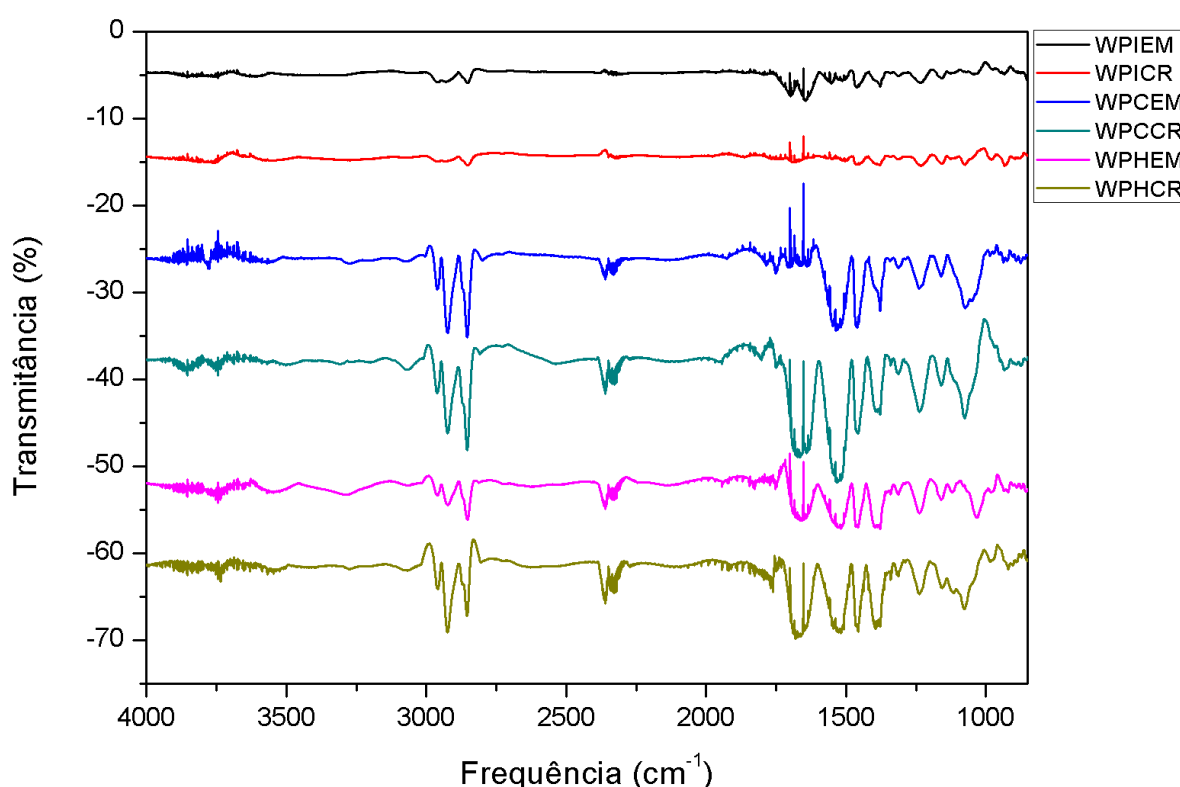


Figura 18: Espectros de FTIR das micropartículas proteicas contendo os óleos essenciais das espécies *S. aromaticum* e *L. origanoides*.

WPIEM – Isolado de Soro de Leite contendo óleo essencial da espécie *L. origanoides* (erva-de-Marajó); **WPICR** – Isolado de Soro de Leite contendo óleo essencial da espécie *S. aromaticum* (cravo-da-Índia); **WPCEM** – Isolado de Soro de Leite Concentrado contendo óleo essencial da espécie *L. origanoides* (erva-de-Marajó); **WPCCR** – Isolado de Soro de Leite Concentrado contendo óleo essencial da espécie *S. aromaticum* (cravo-da-Índia); **WPHEM** – Isolado de Soro de Leite Hidrolisado contendo óleo essencial da espécie *L. origanoides* (erva-de-Marajó); **WPHCR** – Isolado de Soro de Leite Hidrolisado contendo óleo essencial da espécie *S. aromaticum* (cravo-da-Índia).

Fonte: A autora (2019).

De acordo com os espectros de FTIR, pode-se verificar as bandas características referentes aos compostos que compõem o isolado do soro de leite, em 1633 cm^{-1} e 1525 cm^{-1} , as quais são atribuídas à presença de amidas primária e secundária, respectivamente. Todas as amostras apresentaram bandas associadas às proteínas β -lactoglobulina e α -lactoalbumina: os picos entre 1600 e 1700 cm^{-1} , segundo (DUONGTHINGOC et al., 2013; GASPARINI, 2016), referem-se às vibrações moleculares β , α – hélice provenientes de proteínas. Dessa forma, esses dados corroboram os dados encontrados neste presente estudo.

Além disso, pode-se aferir que os sistemas de Isolado do Soro de Leite (WPI) apresentaram maior interação com o material de núcleo (óleos essenciais), devido à diminuição da frequência juntamente com o aumento da largura dos picos entre 2800 e 3000 cm^{-1} . Esse fenômeno é atribuído à eficiência de encapsulação dos materiais de núcleo. Portanto, os sistemas baseados em WPC e WPH apresentaram menor interação com os óleos essenciais das espécies *S. aromaticum* e *L. origanoides*, apresentando picos característicos presentes nos óleos essenciais, resultantes de óleos essenciais livres nos sistemas.

CAPÍTULO III

9. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

9.1 Lipossomos

Os **lipossomos** são vesículas constituídas de uma ou mais bicamadas orientadas concentricamente em torno de um compartimento aquoso e servem como carreadores de moléculas ativas. As partículas a base de lipídios podem ser compostas por fosfolipídios, triacilglicerídeos, ácidos graxos, entre outros. São muito utilizadas por poderem encapsular compostos com diferentes solubilidades devido ao seu caráter hidrofílico e hidrofóbico (GRAÇA; FERREIRA, 2015). Os lipídios mais utilizados são os fosfolipídios, representados na **Figura 19** pela fosfatidilcolina, a qual apresenta como grupo polar a colina e fosfato (grupos de cabeça) e a calda apolar constituído por hidrocarbonetos contendo insaturação, sendo empregados na formação de lipossomas.

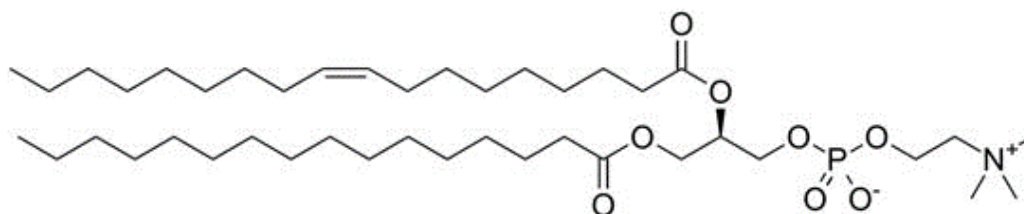


Figura 19: Representação estrutura molecular da fosfatidilcolina.

Fonte: A autora (2019)

Esse tipo de material de parede tem a habilidade de encapsular substâncias hidrofílicas e lipofílicas, sendo que as primeiras ficam no meio aquoso e as lipofílicas permanecem inseridas na membrana (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007). Esses compostos geralmente são protetores hidrofílicos e/ou grupos hidrofóbicos, cuja seleção depende do material do núcleo e as características desejadas das cápsulas, tais como, a natureza e a estabilidade do material a ser encapsulado (E. L. CARMO, R. V. B. FERNANDES, 2015).

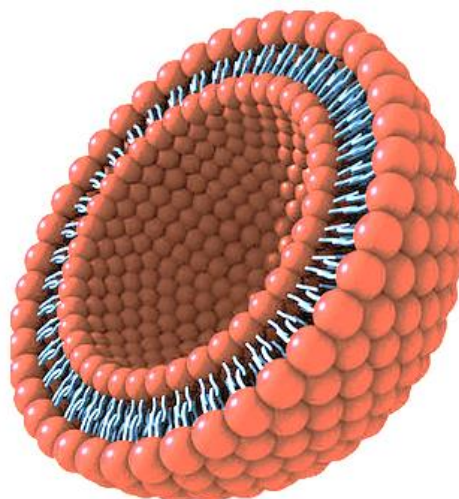


Figura 20: Representação de partícula de lipossomos em bicamada.

Os lipossomos podem apresentar uma bicamada ou diversas (múltiplas) bicamadas, assim, podendo ser classificados como unilamelares ou multilamelares, respectivamente. De acordo com o tamanho, os lipossomos podem ainda ser classificados em lipossomos multilamelares grandes (MLV – multilamellar large vesicles) lipossomos unilamelares grandes (LUV – large unilamellar vesicles), lipossomos unilamelares pequenos (SUV – small unilamellar vesicles) (SUTHAR, S.M.; RATHVA, 2019). O método de preparação dos lipossomos apresenta influencia na obtenção do tamanho do lipossomo.

Os sistemas lipossomais, apresentam características encapsulantes de diversas substâncias que apresentam bioatividade. Além disso, há variações de técnicas de formação dos lipossomas, tais como hidratação de vesículas, evaporação por fase reversa, magnetolipossomos, dentre outros como descritos por (DE LIMA et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2018b; MARQUES et al., 2013).

O método de Hidratação de filme ou Hidratação de vesículas é largamente utilizado para obtenção de MLV's. A metodologia consiste na solubilização do lipídio e evaporação de solvente orgânico para a formação do filme lipídico que é hidratado para a formação dos lipossomos. Para a preparação de SUV ou LUV os métodos variam em evaporação de fase reversa, desidratação-hidratação, sonicação, dentre outros conforme KARAMI, (2018).

10. MATERIAIS E MÉTODOS

10.1 Síntese de Nanopartículas de Lipossomos pelo Método de Hidratação de Vesículas

Para a preparação dos lipossomos foi utilizado o método de hidratação de vesículas, de acordo com (HOPE, M.J.; BALLY, M.B.; MAYER, L.D.; JANOFF, A.S.; CULLIS, 1986), com modificações. O lipídio utilizado foi a asolecitina de soja (ASO) como material de parede para a encapsulação dos óleos essenciais *S. aromaticum* e *Lippia origanoides*. Nesses sistemas foram inseridos como conservantes: Ácido cítrico, Benzoato de sódio, Conserv NE®, Conserv MI® e Timol na concentração de 0,02%. Este método consiste em uma co-solubilização do lipídio em clorofórmio, seguida da sua retirada por rotaevaporador LGI-52CS-1 (LGI Scientific), entre 35 e 37 °C, para a formação do filme lipídico. O solvente remanescente foi retirado em dessecador por 1 h. O filme lipídico foi hidratado com água destilada e então submetido ao vórtex. Após completa homogeneização, o sistema foi submetido à agitação mecânica em ultraturrax Gehaka (modelo ULTRA DU-15) por 30 s.

10.2 Eficiência de Encapsulação (EE)

Para determinação da EE dos lipossomos foi utilizado o método descrito por (IMURA et al., 2003) com adaptações de leitura em UV-vis. A emulsão obtida pelo método de hidratação de vesículas foi centrifugada por 20 min, a 15000 rpm e com temperatura de 4°C. Em seguida, as partículas sedimentadas foram liofilizadas. Após a liofilização, 10 mg de cada amostra foram adicionados 5 mL de metanol para a abertura da cadeia lipídica. Uma alíquota de 3 mL foi utilizada para a leitura em UV-vis, onde a absorbância obtida foi utilizada para o cálculo da concentração de ativo utilizando-se a curva de calibração previamente determinada. Tendo a concentração obtida, foi calculada a EE pela equação:

$$EE\% = \frac{C_L}{C_E} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

onde, EE% é a eficiência de encapsulação em porcentagem, C_L é a concentração liberada e C_E é concentração encapsulada.

10.3 Medidas de HATR - FTIR do Nanossistema Lipossômico

Os espectros de infravermelho das amostras contendo ASO, óleo de *S. aromaticum* e *L. origanoides* encapsulados em ASO foram obtidos no espectrofotômetro Shimadzu-IR Prestige-21, na Universidade Federal de Rio Grande - FURG, em temperatura ambiente, com média de 40 varreduras entre 4000 e a 400 cm^{-1} (CHEN; TRIPP, 2008). Foi utilizado 1 mL de amostra em cristal de seleneto de zinco. Foram analisadas a variação de largura (a 75% da altura do pico) e frequência, referentes aos picos característicos dos grupos lipídicos (nanopartículas de lipossomos).

10.4 Medidas de Turbidez do Nanossistema Lipossômico

Para a análise da turbidez foi realizada de acordo com o método descrito por (DOS SANTOS et al., 2016), com adaptações. Nas medidas foi utilizado o espectrofotômetro Global trade UV-6100, a 400 nm utilizando um caminho óptico de 1 cm em células de quartzo. Pela variação dos valores de absorbância foram analisadas as interferências das amostras contendo somente lipídio e contendo óleo encapsulado em lipídio.

10.5 Medidas de ^1H (Medidas de T_1) e ^{31}P do Nanossistema Lipossômico

O estudo de anisotropia do deslocamento químico do grupo fosfato lipídico foi realizado em equipamento Bruker 400 MHz, na frequência de 161 MHz, em temperatura ambiente, usando como referência externa água deuterada. Os picos foram analisados a partir de medidas de largura a 75% do pico de fósforo. Todas as amostras analisadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram preparadas na proporção 80:20 (v/v) dos sistemas com $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (DE LIMA et al., 2007).

10.6 Medidas de DLS e Potencial Zeta (ζ) do Nanossistema Lipossômico

Para as medidas do tamanho de partícula e potencial zeta foi realizada de acordo com o método descrito por (LOPES DE AZAMBUJA *et al.*, 2015). Nas medidas foi utilizado o equipamento Litesize 500, na Universidade Federal do Rio Grande – FURG, a 25 °C, com caminho óptico de 1 cm e ângulo fixo de 175°, utilizando como dispersante água milli Q. As amostras foram preparadas utilizando 25 µL da amostra solubilizada em 1 mL de água milli Q e homogeneizada em vórtex.

11. RESULTADOS E DISCUSSÕES

11.1 Nanopartículas Lipossomais

11.2 Medidas de Turbidez

Os valores de turbidez dos sistemas lipídicos Aso e Aso/CR, e suas variações para o sistema contendo óleo essencial da *S. aromaticum* estão apresentados na **Tabela 12**.

Tabela 12: Valores de turbidez dos sistemas de lipossomos Aso e Aso/CR

Amostras	Turbidez (NTU) ± DP	Δ Valores de turbidez ± DP	% de turbidez
Aso	0,448 ± < 0,01	-	-
Aso/CR	0,459 ± < 0,01	0,011 ± < 0,01	↑ 2,4
AsoCR/AC	0,507 ± < 0,01	0,059 ± < 0,01	↑ 13,1
AsoCR/TIM	0,573 ± < 0,01	0,125 ± < 0,01	↑ 27,9
AsoCR/MI	0,528 ± < 0,01	0,080 ± < 0,01	↑ 17,8
AsoCR/NE	0,659 ± < 0,01	0,211 ± < 0,01	↑ 47,0
AsoCR/BS	0,513 ± < 0,01	0,065 ± < 0,01	↑ 14,5
Aso/EM	0,696 ± < 0,01	0,248 ± < 0,01	↑ 55,3
AsoEM/AC	0,606 ± < 0,01	0,158 ± < 0,01	↑ 35,2
AsoEM/TIM	0,627 ± < 0,01	0,179 ± < 0,01	↑ 39,9
AsoEM/MI	0,654 ± < 0,01	0,206 ± < 0,01	↑ 45,9
AsoEM/NE	0,451 ± < 0,01	0,003 ± < 0,01	↑ 0,6
AsoEM/BS	0,585 ± < 0,01	0,137 ± < 0,01	↑ 30,5

DP = desvio padrão; Aso = asolecitina de soja; EM = óleo essencial da *L. origanoides*; CR = óleo da *S. aromaticum*; AC = ácido cítrico; TIM = timol; MI = conserv MI[®]; NE = conserv NE[®]; BS = benzoato de sódio.

Os sistemas contendo os óleos essenciais da *S. aromaticum* e da *L. origanoides* apresentaram aumento da turbidez, o que pode estar associado ao aumento do tamanho das partículas lipossomais. Os sistemas AsoEM com conservantes foram os que apresentaram maiores valores percentuais de turbidez, o que é indicativo de partículas com tamanhos maiores que o lipídio puro e dos sistemas de AsoCR, dados

corroborados pelo tamanho médio obtido na análise de DLS - Dynamic Light Scattering (**Tabela 13**). Segundo (DOS SANTOS et al., 2018b), o tamanho e o efeito de agregação podem causar um aumento na turbidez do sistema, e são dependentes de fatores como preparação, condições ambientais, temperatura e forma molecular.

Neste caso, o aumento da turbidez pode estar relacionado ao aumento do tamanho das partículas quando há a incorporação do óleo essencial, dado que corrobora com o tamanho das nanopartículas de lipossomos obtido por DLS e mostrado na **Tabela 13**.

11.3 Medidas de DLS e Potencial Zeta (ζ)

A análise por DLS permitiu verificar que as nanopartículas obtidas possuem tamanho médio de diâmetro de 167 nm para o sistema de Aso puro. Após o encapsulamento do óleo essencial da *S. aromaticum* foi observado um aumento médio de diâmetro da nanopartículas, entre 282 a 441 nm (considerando diferentes conservantes). Para os sistemas contendo óleo essencial da *L. origanoides* também houve um aumento expressivo, apresentando tamanho médio de diâmetros de 260 a 575 nm (considerando diferentes conservantes). A partir do tamanho de partícula foi possível classificar os lipossomos como LUV (*large unilamellar vesicles*) ou vesículas unilamelares grandes, as quais apresentam tamanho entre 100 e 1000 nm (MONTEIRO et al., 2014; THE et al., 2002).

Os valores de potencial zeta são apresentados na **Tabela 13**. Nota-se que, mesmo com a incorporação do óleo essencial da *S. aromaticum*, *L. origanoides* e conservantes, houve aumento para valores menores que -54 mV em relação ao lipídio puro (Aso). Sistemas particulados com valores de potencial zeta menores que -30 mV são considerados estáveis, diminuindo os processos de desestabilização das emulsões, como aglomeração, floculação, cremação e separação de fase (MONTEIRO et al., 2014). Segundo (SCHAFFAZICK et al., 2003), altos valores (em módulo) de potencial zeta contribuem para a obtenção de boa estabilização físico-química de suspensões, pois com o aumento do potencial zeta há o aumento das forças repulsivas que tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais das nanopartículas.

Tabela 13: Valores do potencial zeta (ζ) e tamanho de partículas por DLS.

Amostra	Média do Potencial Zeta (mV) $\pm$ DP	Tamanho Médio (nm) $\pm$ DP
Aso	- 54 $\pm$ 2	167 $\pm$ 1
Aso/CR	- 53 $\pm$ 1	282 $\pm$ 2
Aso/CR-AC	- 59 $\pm$ 1	355 $\pm$ 2
Aso/CR-TIM	- 59 $\pm$ 1	313 $\pm$ 3
Aso/CR-MI	- 61 $\pm$ 2	372 $\pm$ 1
Aso/CR-BZ	- 59 $\pm$ 1	326 $\pm$ 3
Aso/CR-NE	- 62 $\pm$ 1	441 $\pm$ 3
Amostra	Média do Potencial Zeta (mV) $\pm$ DP	Tamanho Médio (nm) $\pm$ DP
Aso/EM	-58 $\pm$ 2	575 $\pm$ 1
Aso/EM-AC	-62 $\pm$ 2	371 $\pm$ 1
Aso/EM-TIM	-57 $\pm$ 1	291 $\pm$ 2
Aso/EM-MI	-60 $\pm$ 1	554 $\pm$ 3
Aso/EM-BZ	-59 $\pm$ 1	260 $\pm$ 3
Aso/EM-NE	-60 $\pm$ 1	396 $\pm$ 1

DP = desvio padrão; Aso = asolecitina de soja; EM = óleo de erva do Marajó (*L. origanoides*); CR = óleo de cravo (*S. aromaticum*); AC = ácido cítrico; TIM = timol; MI = conserv MI[®]; NE = conserv NE[®]; BS = benzoato de sódio.

11.4 Medidas de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (HATR-FTIR)

Os resultados obtidos por FTIR obtidos para elucidação da interação entre o óleo essencial encapsulado no lipossomo são interpretados baseados em regiões características do lipídio fosfatidilcolina: grupo fosfato (PO_2^-), colina ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), carbonila ($\text{C}=\text{O}$) e metileno (CH_2).

Os espectros de HATR-FTIR dos sistemas de lipossomos contendo os óleos essenciais da *S. aromaticum* e *L. origanoides* puros e com conservantes são mostrados na **Figura 22 e 23** em linhas preta e azul, respectivamente. A partir dos espectros, foram calculados os valores de variação da frequência e largura a 75% dos principais picos característicos de lipídios.

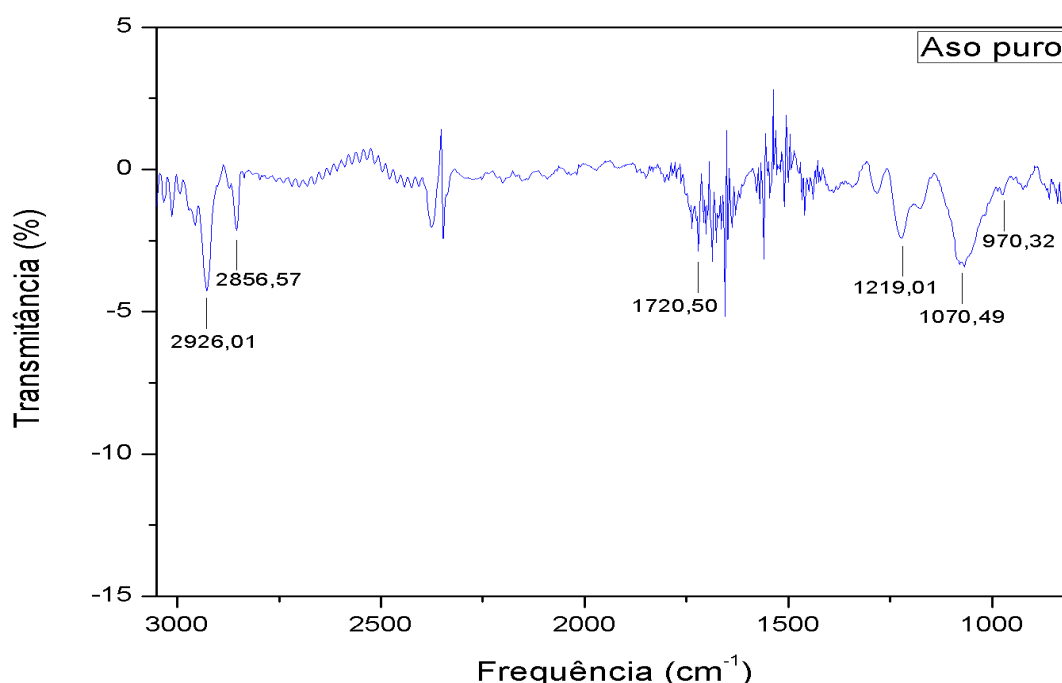


Figura 21: Espectros de HATR-FTIR do sistema de lipossomos contendo somente Aso.

Com a inserção dos óleos essenciais da *S. aromaticum* e *L. origanoides*, pode-se verificar a redução da frequência do estiramento axial assimétrico do grupo polar, o fosfato lipídico ($\nu_{as} PO_2^-$), nos sistemas Aso/CR, AsoCR-TIM, AsoCR-MI, AsoCR-NE, AsoCR-BS, Aso/EM, AsoEM-BS. A diminuição na frequência do grupo fosfato, segundo (MORENO et al., 2009), é atribuído ao grau de hidratação da substância. Este fenômeno é causado pela interação dos átomos de hidrogênio das moléculas de água com o grupo fosfato carregado negativamente. Para os sistemas AsoCR-AC, AsoEM-NE, foi observado o aumento da frequência do grupo fosfato, o que propõe um menor grau de hidratação dessas substâncias. Os sistemas AsoEM-AC e AsoEM-MI não apresentaram variações de frequência do grupo fosfato.

Além do aumento na hidratação do lipídio, a diminuição da frequência pode ser causada por interações com moléculas adjacentes que podem ocasionar mudanças como variação da polaridade do ambiente e orientação molecular (DOS SANTOS et al., 2018a; MORENO et al., 2009).

Os grupos de cabeça, C=O e $N^+(CH_3)_3$, também podem revelar a interação entre a água e interface do lipídio, polaridade, além da natureza das interações entre a ligação de hidrogênio. No grupo carbonílico, a variação na frequência está diretamente relacionada com o grau de hidratação, devido às ligações de hidrogênio. Já no grupo colina, a interação ocorre por dipolos, uma vez que o nitrogênio está com carga positiva, eliminando a possibilidade de ligações de hidrogênio com a água.

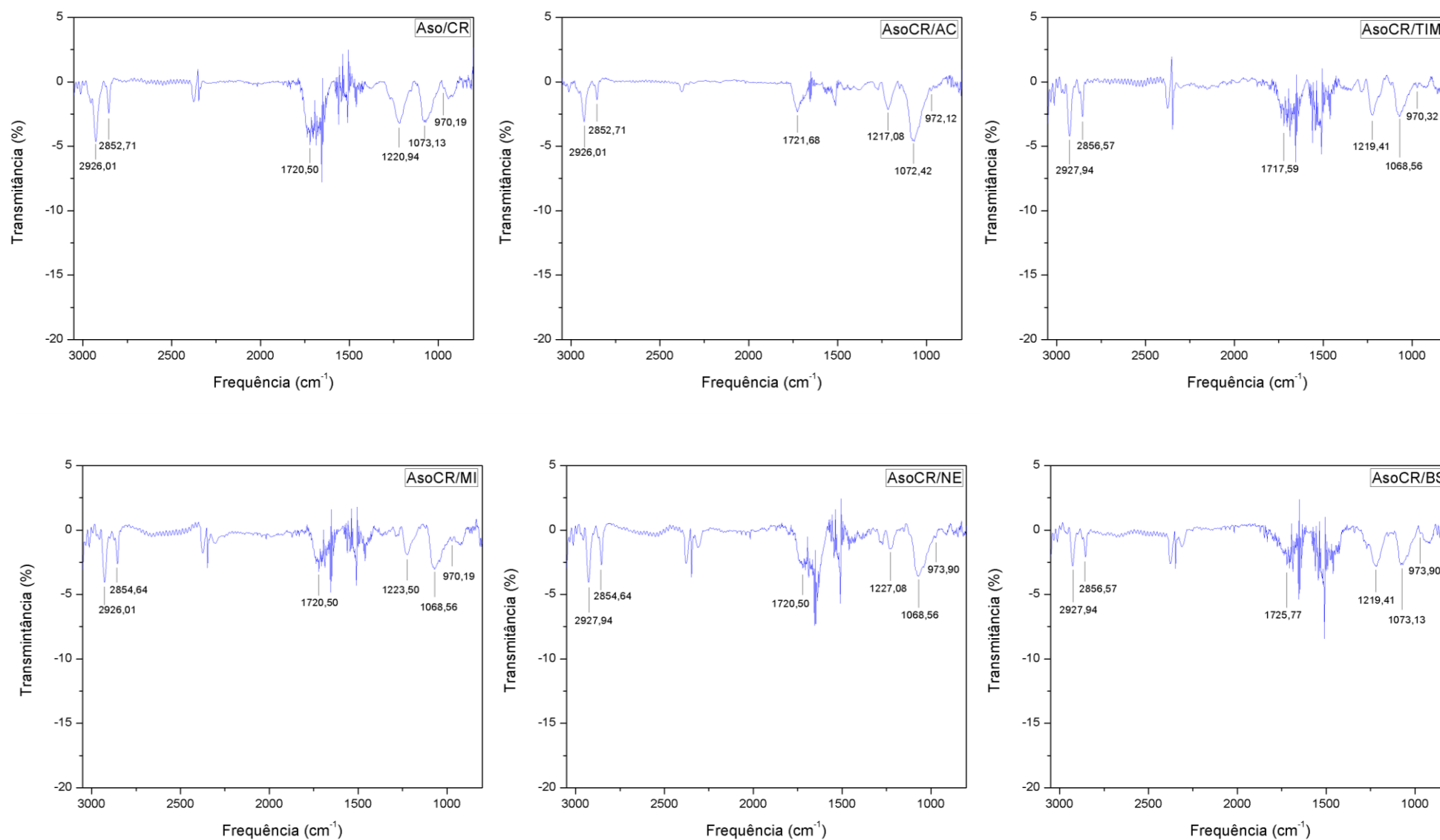


Figura 22: Espectros de HATR-FTIR dos sistemas de lipossomos contendo somente Aso/CR com conservantes.

Fonte: A autora (2019).

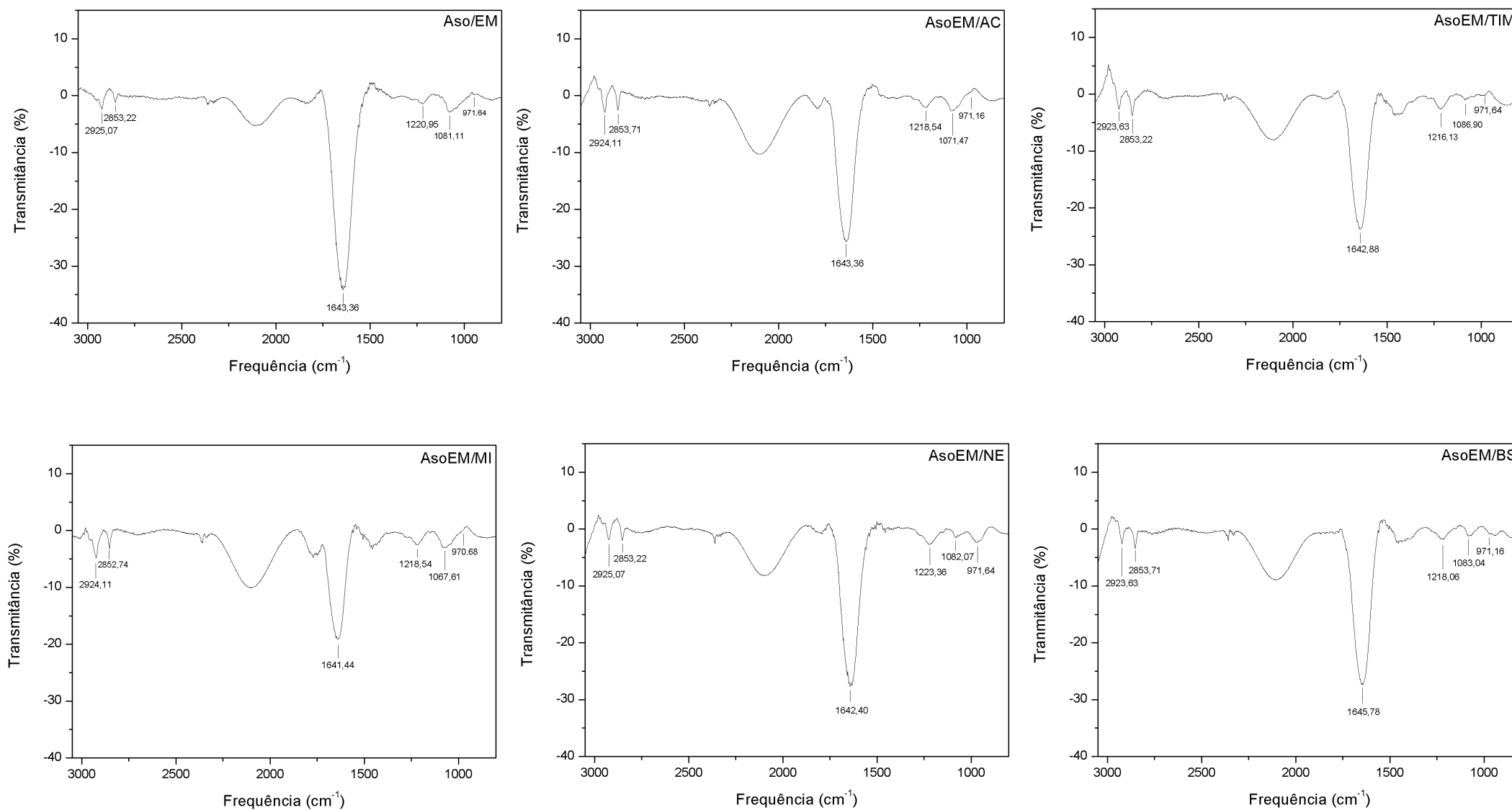


Figura 23: Espectros de HATR-FTIR dos sistemas de lipossomos contendo somente Aso/EM com conservantes.

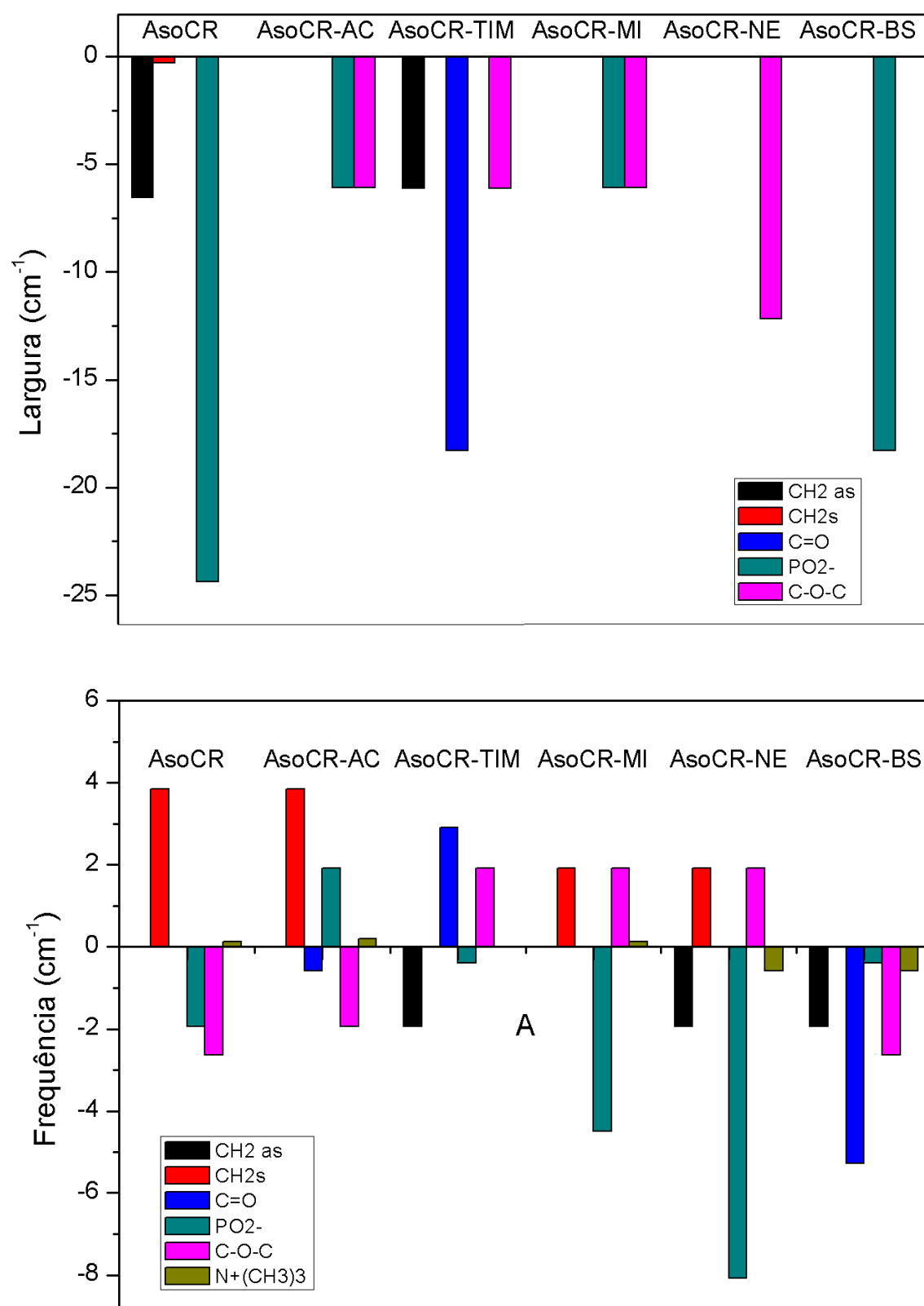


Figura 24: Variação de largura e frequência das medidas de HATR-FTIR dos sistemas lipossomais contendo *S. aromaticum* e conservantes

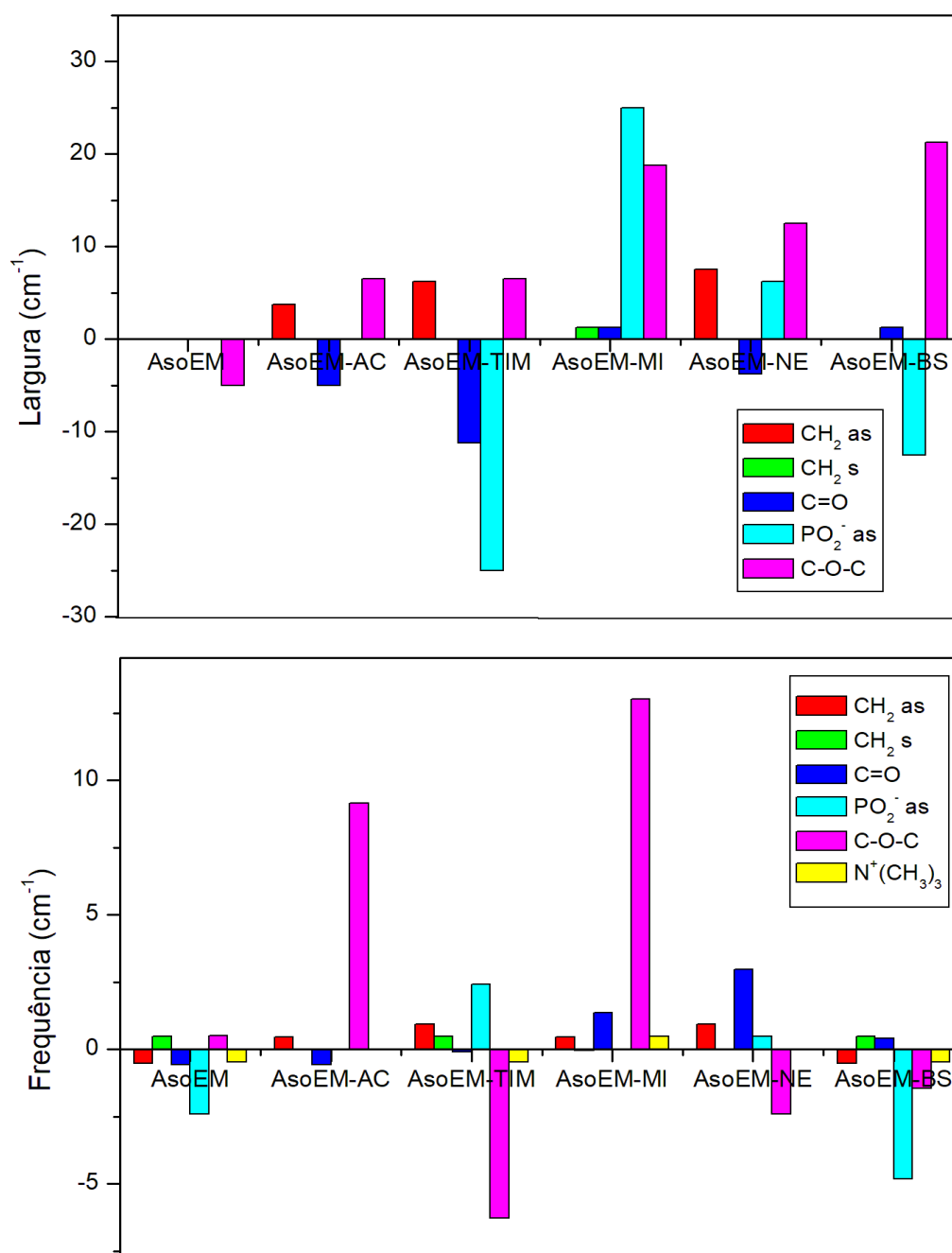


Figura 25: Variação de largura e frequência das medidas de HATR-FTIR dos sistemas lipossomais contendo *L. organoides* e conservantes

O aumento da frequência nos grupos metilenos (CH_2) simétrico e assimétricos, corresponde ao aumento da conformação gauche e mobilidade dos grupos nas cadeias de hidrocarbonetos, dados corroborados com o estudo de (BENESCH; LEWIS; MCELHANEY, 2016) que reporta a organização de membrana de fosfolipídios. (SEVERCAN; SAHIN; KAZANCI, 2005) e (MORENO et al., 2009) relatam que as alte-

rações da frequência do grupo CH₂ está relacionada ao ordenamento, grau de desordem da conformação na isomerização trans/gauche e dinâmica do sistema através da largura das bandas de estiramento do CH₂.

11.5 Análise por Ressonância Magnética (RMN)

Os resultados das análises de RMN de ³¹P, T₁ (colina e metileno) estão dispostos nas **Figuras 26 a 28**.

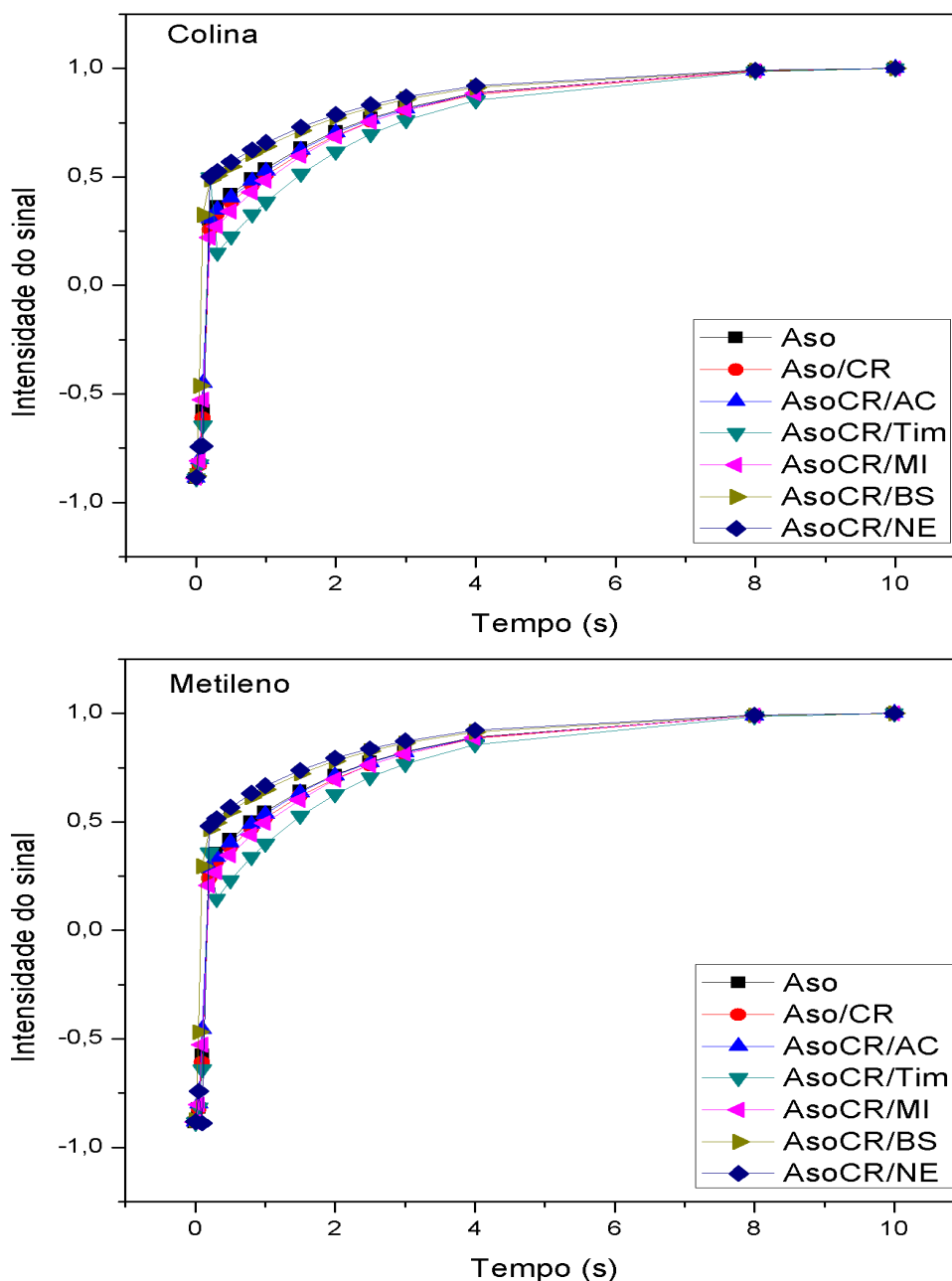


Figura 26: RMN de T₁ da colina e metileno das amostras contendo óleo de *S. aromaticum*.

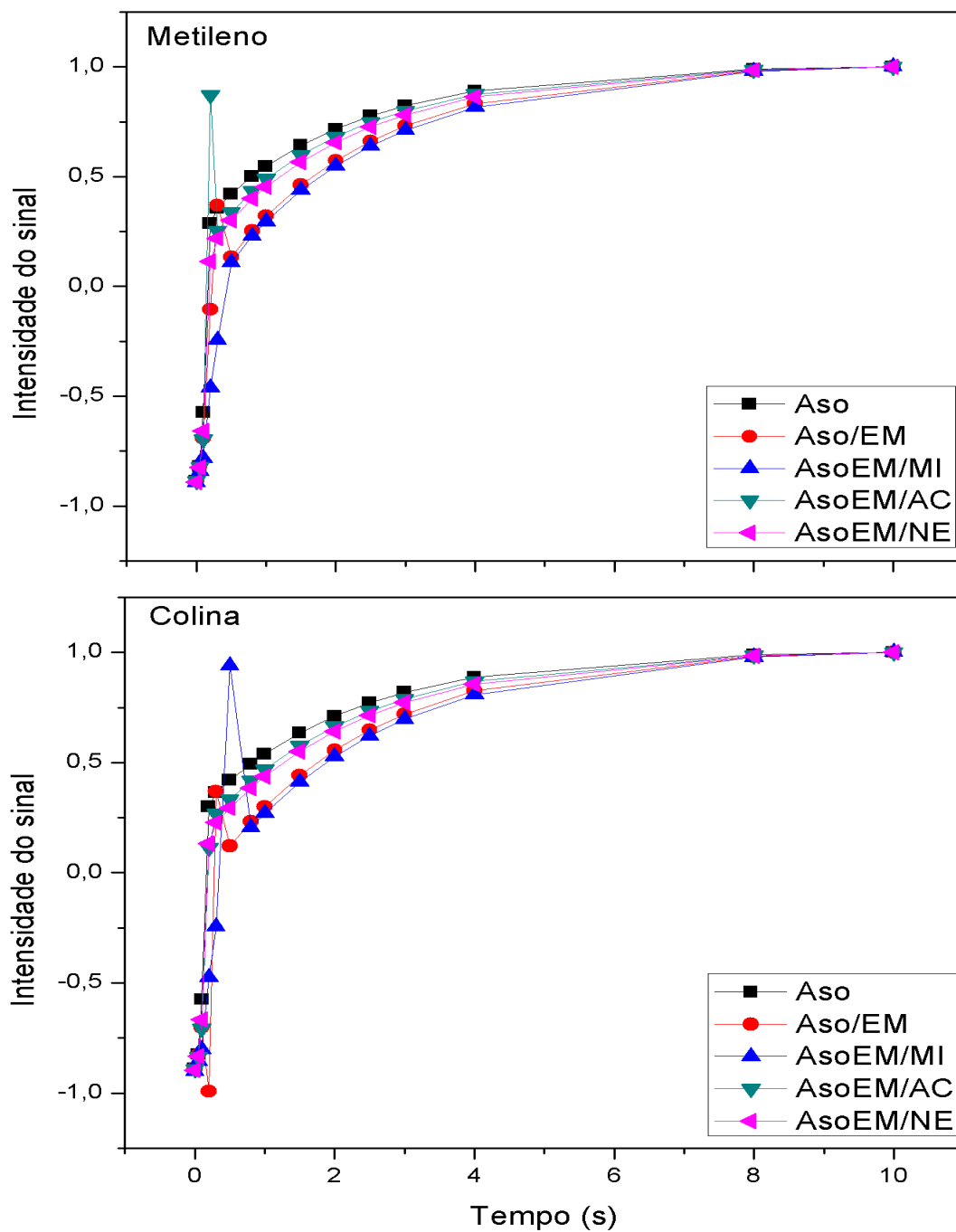


Figura 27: RMN de T1 da colina e metileno das amostras contendo óleo de *L. origanoides*

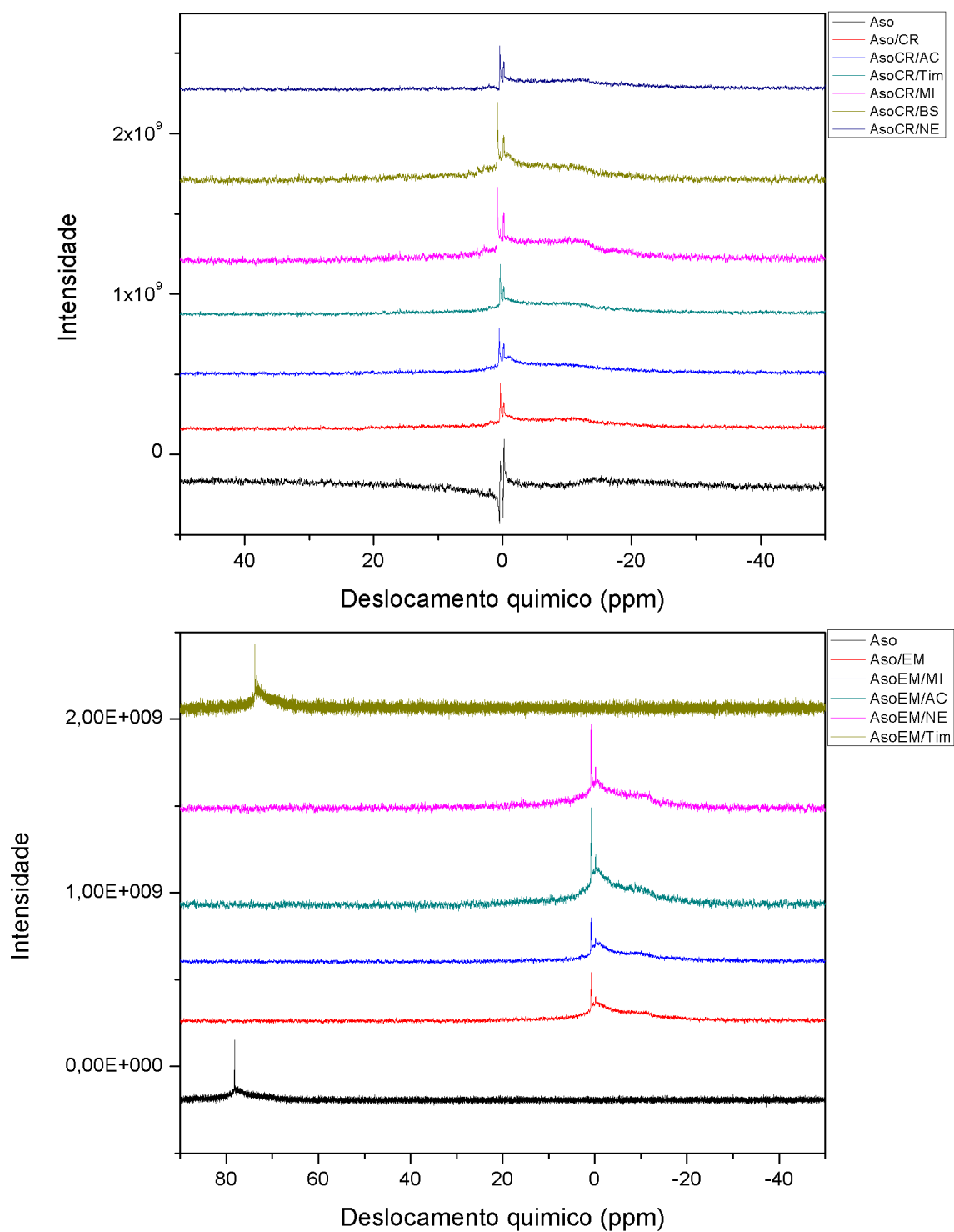


Figura 28: RMN de ^{31}P da amostra de lipossomas contendo óleo essencial de *L. organoides* e *S. aromaticum*.

A variação de T_1 dos grupos colina (3,2 ppm) e metilenos (1-2,0 ppm) ficaram em torno de 0,005 e 0,605 s, valores que demonstram um aumento na mobilidade do sistema com a incorporação do óleo essencial da *S. aromaticum* e *L. origanoides*, porém não representam influência significativa no T_1 dos hidrogênios presentes na colina dos lipossomos contendo óleo de *S. aromaticum* e conservantes. O mesmo foi observado por (DE LIMA et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2018b).

Tabela 14: Variação de T_1 e ^{31}P dos lipossomos contendo óleo essencial da *S. aromaticum*

Amostra	RMN ^1H ^{31}P	Valores ^1H ^{31}P	Δ
Aso	^1H (T_1) $\text{N}^+(\text{CH}_3)$	0,179 s	-
	^1H (T_1) CH_2	0,182 s	-
	^{31}P	6,3090 ppm	-
Aso/CR	^1H (T_1) $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	0,201 s	↑ 0,022 s
	^1H (T_1) CH_2	0,206 s	↑ 0,024 s
	^{31}P	9,6883 ppm	↑ 3,3793 ppm
AsoCR/Ácido cítrico	^1H (T_1) $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	0,198 s	↑ 0,019 s
	^1H (T_1) CH_2	0,202 s	↑ 0,020 s
	^{31}P	9,6323 ppm	↑ 3,3233 ppm
AsoCR/Timol	^1H (T_1) $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	0,190 s	↑ 0,011 s
	^1H (T_1) CH_2	0,196 s	↑ 0,014 s
	^{31}P	11,3521 ppm	↑ 5,0431 ppm
AsoCR/MI	^1H (T_1) $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	0,199 s	↑ 0,020 s
	^1H (T_1) CH_2	0,203 s	↑ 0,021 s
	^{31}P	11,1413 ppm	↑ 4,8323 ppm
AsoCR/NE	^1H (T_1) $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	0,184 s	↑ 0,005 s
	^1H (T_1) CH_2	0,191 s	↑ 0,009 s
	^{31}P	5,5843 ppm	↓ 0,7247 ppm
AsoCR/Benzoato de sódio	^1H (T_1) $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	0,209 s	↑ 0,030 s
	^1H (T_1) CH_2	0,217 s	↑ 0,035 s
	^{31}P	5,6862 ppm	↓ 0,6228 ppm

Aso = asolecitina de soja; EM = óleo de erva do Marajó (*L. origanoides*); CR = óleo de cravo (*S. aromaticum*); AC = ácido cítrico; TIM = timol; MI = conserv MI[®]; NE = conserv NE[®]; BS = benzoato de sódio.

Tabela 15: Variação de T_1 e ^{31}P dos lipossomos contendo óleo essencial da *L. origanoides*

Amostra	RMN ^1H ^{31}P	Valores ^1H ^{31}P	Δ
Aso	^1H (T_1) $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	0,179 s	-
	^1H (T_1) CH_2	0,182 s	-
	^{31}P	6,3090 ppm	-
Aso/EM	^1H (T_1) $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	0,659 s	↑ 0,480 s
	^1H (T_1) CH_2	0,636 s	↑ 0,454 s
	^{31}P	5,4116ppm	↓ 0,8674ppm
AsoEM/Ácido cítrico	^1H (T_1) $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	0,339 s	↑ 0,160 s
	^1H (T_1) CH_2	0,352 s	↑ 0,170 s
	^{31}P	4,2385 ppm	↓ 2,0705 ppm
AsoEM/Timol	^1H (T_1) $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	0,216 s	↑ 0,037 s
	^1H (T_1) CH_2	0,202 s	↑ 0,020 s
	^{31}P	5,4265 ppm	↓ 0,882 ppm
AsoEM/MI	^1H (T_1) $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	0,784 s	↑ 0,605 s
	^1H (T_1) CH_2	0,750 s	↑ 0,568 s
	^{31}P	5,7525 ppm	↓ 0,5565 ppm
AsoEM/NE	^1H (T_1) $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	0,352 s	↑ 0,173 s
	^1H (T_1) CH_2	0,360 s	↑ 0,178 s
	^{31}P	4,1560 ppm	↓ 2,1530 ppm
AsoEM/Benzoato de sódio	^1H (T_1) $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	0,216 s	↑ 0,037 s
	^1H (T_1) CH_2	0,144 s	↑ 0,038 s

Aso = asolecitina de soja; EM = óleo de erva do Marajó (*L. origanoides*); CR = óleo de cravo (*S. aromaticum*); AC = ácido cítrico; TIM = timol; MI = conserv MI[®]; NE = conserv NE[®]; BS = benzoato de sódio.

Na análise de RMN de ^{31}P , pode-se verificar que a conformação do fosfolipídio é hexagonal, devido à presença do “ombro” a campo alto. Além disso, foram obtidas informações sobre o grupo fosfato, revelando um aumento na largura do pico no espectro de fósforo em 3,32 ppm a 5,04 ppm para os sistemas contendo óleo essencial da *S. aromaticum* e os conservantes ácido cítrico, timol e MI dos sistemas contendo óleo essencial encapsulado, refletindo no aumento da anisotropia do deslocamento químico. Este aumento pode estar relacionado com a restrição da mobilidade deste

grupo, o que significa maior ordem no sistema lipídico (TIMOSZYK; GDANIEC; LATANOWICZ, 2004), dados que corroboram com a análise de FTIR.

De acordo com os dados obtidos para os sistemas contendo o óleo essencial da *S. aromaticum* e os conservantes benzoato de sódio, NE e todos os sistemas contendo o óleo de *L. origanoides* e conservantes, apresentaram a diminuição na largura do pico no espectro de fósforo. Esta diminuição da anisotropia do deslocamento químico representa uma menor restrição da mobilidade do grupo na cadeia, gerando um desordenamento do sistema lipídico, podendo causar desestabilidade da formulação.

11.6 Eficiência de Encapsulação (EE) dos Lipossomos

A EE estimada pelo método de hidratação de vesículas não apresentou altos valores de encapsulação quando comparados a outros métodos (**Tabela 16**), como fase reversa. Fatores como processos de sonicação e homogeneização podem influenciar no percentual de encapsulação.

Tabela 16: Eficiência de encapsulação dos Lipossomos contendo óleo essencial da *S. aromaticum* e *L. origanoides*

Amostras	EE (%)
Aso/CR	19,8
Aso/CR-AC	10,5
Aso/CR-Tim	18,9
Aso/CR-MI	40,5
Aso/CR-BS	27,8
Aso/CR-NE	8,4
Aso/EM	19,1
Aso/EM-AC	11,3
Aso/EM-Tim	9,4
Aso/EM-MI	38,8
Aso/EM-BS	26,9
Aso/EM-NE	7,9

Aso = asolecitina de soja; EM = óleo de erva do Marajó (*L. origanoides*); CR = óleo de cravo (*S. aromaticum*); AC = ácido cítrico; TIM = timol; MI = conserv MI[®]; NE = conserv NE[®]; BS = benzoato de sódio.

Estudos realizados por (CONCEIÇÃO; MATOS; MOUTINHO, 2009), reportam a encapsulação de fármacos em lipossomos e a baixa eficiência de encapsulação, entre 13% a 22% para os fármacos estudados. Em (BATISTA, 2007), é reportado a

baixa eficiência da encapsulação em sistemas de lipossomos. A interação entre o material de núcleo e o lipídio também influencia a encapsulação.

Os sistemas com maior EE foram os que continham o óleo essencial da *S. aromaticum*. No entanto, a interação com os conservantes pode ter causado variações entre os sistemas. Os sistemas contendo o conservante MI apresentaram elevados valores de encapsulação para ambos os óleos essenciais. Já o sistema contendo o conservante NE apresentou o menor valor de EE para ambos os sistemas, mais baixo do que o descrito na literatura para o método de hidratação de vesículas. Outros fatores relacionados aos valores de EE estão na adaptação da metodologia, inserindo o ultraturrax para melhorar a homogeneização dos sistemas.

12. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sistemas encapsulados mais estáveis foram os de origem proteica (isolados do soro de leite) e o lipídico (fosfatidilcolina). As gomas (arábica, xantana e carragena) não apresentaram emulsões estáveis para servirem de material de parede no encapsulamento dos óleos essenciais testados.

Dos ensaios antimicrobianos realizados, destacam-se duas espécies com bioatividade pronunciada, *Lippia origanoides* e *Syzygium aromaticum*. Para essas duas espécies foram identificadas as concentrações mínimas inibitórias frente aos fungos e a bactéria testados. Neste ensaio pode-se verificar que o óleo essencial da *L. origanoides* apresentou atividade superior ao óleo essencial da *S. aromaticum* contra os fungos dermatófitos, leveduras e bactéria *S. aureus*. O óleo fixo de cumaru, caracterizado por RMN, apresentou a cumarina como constituinte majoritário. Os óleos essenciais das plantas foram caracterizados por cromatografia gasosa, apresentando os compostos fenólicos na maior concentração da constituição química. Os compostos fenólicos foram quantificados e a análise de catálise enzimática corroboraram com a elevada atividade contra os fungos e a bactéria testados.

Por meio das técnicas de caracterização pode-se determinar as características físico-químicas dos materiais encapsulados. Os sistemas contendo os isolados proteicos do soro de leite (WPI) apresentaram maior interação com óleos, o que contribuiu para a elevada eficiência de encapsulação, quando comparados com os isolados do soro de leite concentrado (WPC) e o hidrolisado (WPH). O processo de liofilização influenciou para um baixo teor de umidade na obtenção dos pós. Assim, os sistemas provenientes dos materiais proteicos apresentaram elevada eficiência de encapsulação, em torno de 98%, enquanto os sistemas de lipossomos apresentaram baixa eficiência, variando entre 7% a 40%.

De acordo com as análises de caracterização dos sistemas de lipossomos contendo os óleos essenciais da *S. aromaticum* e *L. origanoides*, a inserção dos conservantes timol e conserv MI®, resultou em maiores indicativos de estabilidade estrutural das formulações. Esse aumento de estabilidade acarretou em um aumento direto da proteção contra processos que causam desestabilidade.

Portanto, ambos os materiais de parede (proteicos e lipídicos) apresentaram capacidade de encapsulação satisfatória para os óleos essenciais das espécies *S.*

aromaticum e *L. origanoides*, bem como os métodos utilizados de obtenção. Destacam-se os sistemas WPI e Aso com conservantes Timol e Conserv MI® como promissores devido à estabilidade observada.

Dessa forma, esse trabalho mostrou que existem alternativas de fontes naturais (óleos essenciais) que possuem atividade fungicida e bactericida pronunciadas. Além disso, foi mostrada viabilidade de encapsulamento desses óleos essenciais em partículas formadas por diferentes materiais de parede. Como os micro-organismos testados fazem parte de um grupo específico que acomete a pele de animais domésticos, especialmente cães e gatos, acredita-se que o trabalho apresentado aqui possa ser considerado como o início de um processo de desenvolvimento de um produto alternativo para o controle dos fungos e bactéria testados.

13. REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4ª ed. Carol Stream: Allured Pub Corp, 2007.
- ALBARICI, T. R.; VIEIRA, P. C. .; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. G. F.; PIRANI, J. R. Cumarinas e alcaloides de *Rauia resinosa* (Rutaceae). **Quimica Nova**, v. 33, n. 10, p. 2130–2134, 2010.
- ALMEIDA, A. C.; OLIVEIRA, L.; PAULO, P. D.; MARTINS, E. R.; SOUZA, R. M.; FIGUEIREDO, L. S.; SANTOS, C. A.; FONSECA, H. C. Potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) e alfavacão (*Ocimum gratissimum* L.) em carne moída de ovinos contaminada experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 20, n. 4, p. 248–251, 2013.
- ALVES, C. C. OL.; RESENDE, J. V.; CRUVINEL, R. S. R.; PRADO, M. E. T. Estabilidade da microestrutura e do teor de carotenóides de pós obtidos da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) liofilizada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 0101–2061, p. 830–839, 2008.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alim. Nutr.**, v. 13, n. 1, p. 89–97, 2005.
- BAE, E. K.; LEE, S. J. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrina. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n. 8, p. 549–560, 2008.
- BARRETO, A. R.; RAMÍREZ-MÉRIDA, L. G.; ETCHEPARE, M. A.; JACOB-LOPES, E.; MENEZES, C. R. Materiais de revestimento utilizados na microencapsulação de probióticos Coating materials used in the microencapsulation of probiotics. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 164–174, 2015a.
- BARRETO, A. R.; RAMÍREZ-MÉRIDA, L. G.; ETCHEPARE, M. A.; JACOB-LOPES, E.; MENEZES, C. R. Materiais de revestimento utilizados na microencapsulação de probióticos Coating materials used in the microencapsulation of probiotics. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 164–174, 2015b.
- BARRETO, H. M. et al. Effect of *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 6, n. 5, p. 560–564, 2014.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. DE; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167–179, 2007.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45,

- p. 493–496, 1966.
- BENESCH, M. G. K.; LEWIS, R. N. A. H.; MCELHANEY, R. N. A calorimetric and spectroscopic comparison of the effects of cholesterol and its sulfur-containing analogs thiocholesterol and cholesterol sulfate on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 2, p. 168–180, 2016.
- BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão new antifungic drugs: a review. **Revista Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 159–172, 2004.
- BESSA, D. T. O. Morfo-anatomia de sementes de *Dipteryx odorata* (aubl.) Will. (Fabaceae) como contribuição ao estudo farmacognóstico de plantas da região amazônica. **Acta amazonica**, v. 31, n. 3, p. 357–364, 2001.
- BOCQUET, L.; RIVIÈRE, C.; DERMONT, C.; SAMAILLIE, J. HILBERT, J-L.; HALAMA, P.; SIAH, A.; SAHPAZ, S. Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. **Industrial Crops and Products**, v. 122, n. February, p. 290–297, 2018.
- BOUARAB-CHIBANE, L.; FORQUET, V.; CLEMENT, Y.; LANTERI, P.; BORDES, C.; BOUAJILA, J.; DEGRAEVE, P.; OULAHAL, N. Effect of interactions of plant phenolics with bovine meat proteins on their antibacterial activity. **Food Control**, v. 90, p. 189–198, 2018.
- BURQUE, R. K.; FRANCESCONI, L. P.; VICTORINO, A. T.; MASCARENHAS, M. Á.; CERESÉR, K. M. Determination of phenolic and evaluation of antioxidant activity of *lafoensia pacari* (*lythraceae*). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2015.
- CAMÊLO, L. C. A.; BLANK, A. F.; EHLERT, P. A. D.; CARVALHO, C. R. D.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; MATTOS, J. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de erva- cidreira-brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]. **Scientia Plena**, v. 7, n. 5, p. 1–8, 2011.
- CAMPELO-FELIX, P. H. et al. Prebiotic carbohydrates: Effect on reconstitution, storage, release, and antioxidant properties of lime essential oil microparticles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 2, p. 445–453, 2017.
- CAMPELO, P. H. et al. Stability of lime essential oil microparticles produced with protein-carbohydrate blends. **Food Research International**, v. 105, n. December 2017, p. 936–944, 2018.
- CAMPOS, Â. D. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 637–643, 2004.
- CARAÇA, A. A. B.; SISTI, E. A Relevância Do *Staphylococcus Aureus* Resistente À Meticilina (Mrsa) Nas Infecções Hospitalares. **Revista Interdisciplinar de Ensino, Pesquisa**

- e Extensão**, v. 4, n. 1, p. 130–140, 2016.
- CASAGRANDE, M. et al. Influence of time, temperature and solvent on the extraction of bioactive compounds of *Baccharis dracunculifolia*: In vitro antioxidant activity, antimicrobial potential, and phenolic compound quantification. **Industrial Crops and Products**, v. 125, n. August, p. 207–219, 2018.
- CDDEP - CENTER FOR DISEASE DYNAMICS, E. & P. **Resistance Map**.
- CHAVES, T. P. et al. Essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn potentiates β -lactam activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* resistant strains. **Industrial Crops and Products**, v. 112, n. June 2017, p. 70–74, 2018.
- CHEN, C.; TRIPP, C. P. An infrared spectroscopic based method to measure membrane permeance in liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 10, p. 2266–2272, 2008.
- CONCEIÇÃO, A. I. F. S.; MATOS, C. M.; MOUTINHO, C. G. Encapsulação de dois fármacos anticancerígenos (5-fluorouracilo e metotrexato) em lipossomas unilamelares. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, v. 6, p. 50–59, 2009.
- CORTÉS-ROJAS, D. F.; DE SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Clove (*Syzygium aromaticum*): A precious spice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 2, p. 90–96, 2014.
- COSTA, J. M. G. **Eficiência de diferentes encapsulantes e conduções operacionais de secagem por atomização na produção e aplicação de micropartículas de bioaroma de queijo suíço**. [s.l.] Universidade Federal de Lavras, 2013.
- COSTA, P. S. et al. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia* sensu lato (Verbenaceae). **Hoehnea**, v. 44, n. 2, p. 158–171, 2017.
- DA SILVA, A. A. et al. Avaliação da atividade óleos essenciais de *thimus vulgaris* (tomilho), *syzygium aromaticum* (cravo-da-india) e *rosmarinus officinalis* (alecrim) e dos conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio em *escherichia coli* e *staphylococcus aureus*. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 33, n. 1, p. 111–117, 2015.
- DALLA LANA, D. F. et al. Dermatofitoses: agentes etiológicos, formas clínicas, terapêutica e novas perspectivas de tratamento. **Clinical & Biomedical Research**, v. 36, n. 4, p. 230–241, 2016.
- DE ALMEIDA, W. S. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia lasiocalycina* Cham. (Verbenaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 125, n. May, p. 236–240, 2018.
- DE AQUINO, L. C. L. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira e manjerição frente a bactérias de carnes bovinas. **Alim. Nutr**, v. 21, p. 529–535, 2010.
- DE LIMA, V. R. et al. Melatonin location in egg phosphatidylcholine liposomes: Possible

- relation to its antioxidant mechanisms. **Journal of Pineal Research**, v. 43, n. 3, p. 276–282, 2007.
- DE LIMA, V. R. et al. Influence of melatonin on the order of phosphatidylcholine-based membranes. **Journal of Pineal Research**, v. 49, n. 2, p. 169–175, 2010.
- DE MOURA, F. M. L. et al. Utilização de plantas do bioma caatinga no controle de patógenos de interesse na área de alimentos -uma revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 2, p. 125–136, 2013.
- DE SOUZA, R. C. et al. Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* against *Aeromonas* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, n. September, p. 29–33, 2017.
- DOS SANTOS, D. M. et al. In Vitro Anti/Pro-oxidant Activities of *R. ferruginea* Extract and Its Effect on Glioma Cell Viability: Correlation with Phenolic Compound Content and Effects on Membrane Dynamics. **Journal of Membrane Biology**, v. 251, n. 2, p. 247–261, 2018a.
- DOS SANTOS, M. C. et al. Self-assembled carbohydrate-based vesicles for lectin targeting. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 148, p. 12–18, 2016.
- DOS SANTOS, M. C. et al. Elucidating *Bauhinia variegata* lectin/phosphatidylcholine interactions in lectin-containing liposomes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 519, p. 232–241, 2018b.
- DUANGMAL, K.; OWUSU APENTEN, R. K. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 351–359, 1999.
- DUARTE, M. C. T. F. ET. AL. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305–311, 2005.
- DUONGTHINGOC, D. et al. Effect of whey protein agglomeration on spray dried microcapsules containing *Saccharomyces boulardii*. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1782–1788, 2013.
- E. L. CARMO, R. V. B. FERNANDES, S. V. B. MICROENCAPSULAÇÃO POR SPRAY DRYING, NOVOS BIOPOLÍMEROS E APLICAÇÕES NA TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Journal of Chemical Engineering and Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 30–44, 2015.
- FARIA MAIA, T.; DE DONATO, A.; ELIAS FRAGA, M. Atividade Antifúngica De Oleos Essenciais De Plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, n. 1, p. 105–116, 2015.
- FERNANDES, R. V. B. Microencapsulamento de óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) através de secagem por atomização. p. 133, 2013.
- FRASCARELI, E. C. **Microencapsulação de óleo de café através de secagem por**

- atomização: avaliação das propriedades da emulsão e do tipo de material de parede sobre as características do pó.** [s.l.] Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2010.
- FUCHS, M.; TURCHIULI, C.; BOHIN, M.; CUVELIER, M. E.; ORDONNAUD, PEYRAT-MAILLARD, M. N.; DUMOULIN, E. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration. **Journal of Food Engineering**, v. 75, p. 27–35, 2006.
- GASPARINI, B. C. **Microencapsulação de vitamina D3 em matriz de proteína isolada de soro de leite.** [s.l: s.n.].
- GRAÇA, J. S.; FERREIRA, M. Liposome-Encapsulated Biomolecules: Application in Enzymatic Biosensors and Immunosensors. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1552–1564, 2015.
- HOPE, M.J.; BALLY, M.B.; MAYER, L.D.; JANOFF, A.S.; CULLIS, P. R. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. **Chem. Phys. Lipids**, v. 40, p. 89–107, 1986.
- IMURA, T. et al. Preparation and physicochemical properties of various soybean lecithin liposomes using supercritical reverse phase evaporation method. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 27, n. 3/2, p. 133–140, 2003.
- KARAMI, N.; MOGHIMIPOUR, E.; SALIMI, A. Liposomes as a novel drug delivery system: Fundamental and pharmaceutical application. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 12, n. 1, p. S31–S41, 2018.
- KHORSHIDIAN, N. et al. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, n. September 2017, p. 62–72, 2018.
- KUHN, J. O. **Indução de resistência em feijoeiro (Phaseolus vulgaris) por acibenzolar-S-metil e Bacillus cereus: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção.** [s.l: s.n.].
- LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia.** 10^a ed. [s.l: s.n.].
- LEYVA-JIMENEZ, F. J. et al. Potential antimicrobial activity of honey phenolic compounds against Gram positive and Gram negative bacteria. **Lwt**, v. 101, n. October 2018, p. 236–245, 2019.
- LI, R.; ROOS, Y. H.; MIAO, S. Characterization of mechanical and encapsulation properties of lactose/maltodextrin/WPI matrix. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 149–159, 2017.
- LOPES DE AZAMBUJA, C. R. et al. Physico-chemical characterization of asolectin-genistein liposomal system: An approach to analyze its in vitro antioxidant potential and effect in glioma cells viability. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 193, p. 24–35, 2015.
- MAHBOUBI, M. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of Thymus species and

- Zataria multiflora essential oils. **Agriculture and Natural Resources**, v. 51, n. 5, p. 395–401, 2017.
- MAR, J. M. et al. Lippia organoides essential oil: An efficient alternative to control Aedes aegypti, Tetranychus urticae and Cerataphis lataniae. **Industrial Crops and Products**, v. 111, 2018a.
- MAR, J. M. et al. Lippia organoides essential oil: An efficient alternative to control Aedes aegypti, Tetranychus urticae and Cerataphis lataniae. **Industrial Crops and Products**, v. 111, n. October 2017, p. 292–297, 2018b.
- MAR CET, I. et al. Production and characterisation of biodegradable PLA nanoparticles loaded with thymol to improve its antimicrobial effect. **Journal of Food Engineering**, v. 239, p. 26–32, 2018.
- MARCHESE, A. et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, p. 402–414, 2016.
- MARIATH, I. R., LIMA, I. O., ET. AL. Atividade antifúngica do óleo essencial de Eugenia aromatica B. contra fungos dematiáceos. **Rev. Bras. Farm.**, v. 87, n. 3, p. 81–84, 2006.
- MARQUES, A. V. et al. Isoniazid interaction with phosphatidylcholine-based membranes. **Journal of Molecular Structure**, v. 1051, p. 237–243, 2013.
- MEDEIROS, F. C. M. D. et al. Fungicidal activity of essential oils from Brazilian Cerrado species against wood decay fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 114, p. 87–93, 2016.
- MONTEIRO, N. et al. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 11, n. 101, p. 20140459, 2014.
- MOREIRA, V. E. et al. Teores de fenóis totais e flavonoides e avaliação da atividade antioxidante de Baccharis trimera (Less .) DC . (Asteraceae). **HU Revista**, v. 38, n. 2, p. 45–51, 2012.
- MORENO, M. M. et al. The membrane-activity of Ibuprofen, Diclofenac, and Naproxen: A physico-chemical study with lecithin phospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1788, n. 6, p. 1296–1303, 2009.
- MUKAI-CORREA, R. et al. Caracterização de Microcápsulas Contendo Caseína e Gordura Vegetal Hidrogenada Obtidas por Gelificação Iônica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 73–80, 2005.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7ª ed. [s.l: s.n.].
- NUNES, M. R. et al. Antioxidant and antimicrobial methylcellulose films containing Lippia alba extract and silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 192, p. 37–43, 2018.
- OLIVEIRA, D. R. et al. Ethnopharmacological study of two Lippia species from Oriximiná,

- Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 1, p. 103–108, 2006.
- OLIVEIRA, D. R. et al. Ethnopharmacological studies of *Lippia origanoides*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 2, p. 206–214, 2014.
- OLIVEIRA, R. et al. Artigo. n. June 2014, 2009.
- PANAHI, Y. et al. Investigation of the effectiveness of *Syzygium aromaticum*, *Lavandula angustifolia* and *Geranium robertianum* essential oils in the treatment of acute external otitis: A comparative trial with ciprofloxacin. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 47, n. 3, p. 211–216, 2014.
- PATZKE, H.; SCHIEBER, A. Growth-inhibitory activity of phenolic compounds applied in an emulsifiable concentrate - ferulic acid as a natural pesticide against *Botrytis cinerea*. **Food Research International**, v. 113, n. June, p. 18–23, 2018.
- PEREIRA, L. J. B.; GARCIA-ROJAS, E. E. Emulsões múltiplas: formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 155–162, 2015.
- PINHEIRO ALVES, M. et al. Soro De Leite: Tecnologias Para O Processamento De Coprodutos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 212, 2014.
- PIRES, C. A. et al. Infecções bacterianas primárias da pele: perfil dos casos atendidos em um serviço de dermatologia na Região Amazônica, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 2, p. 45–50, 2015.
- RAJESH, K. M. et al. Assisted green synthesis of copper nanoparticles using *Syzygium aromaticum* bud extract: Physical, optical and antimicrobial properties. **Optik**, v. 154, p. 593–600, 2018.
- RATTI, R. P.; SOUSA, C. P. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 137–143, 2009.
- RODRIGUES, J. B. DOS S. et al. Efficacy of using oregano essential oil and carvacrol to remove young and mature *Staphylococcus aureus* biofilms on food-contact surfaces of stainless steel. **Lwt**, v. 93, n. March, p. 293–299, 2018.
- SANDRA CRISTINA, V. et al. Ação de tinturas e óleos essenciais de plantas medicinais sobre o crescimento bacteriano comum do feijoeiro e na produção de proteínas de indução de resistência. **Summa Phytopathologica**, n. 13, p. 293–304, 2009.
- SARTO, M. M.; ZANUSSO JUNIOR, G. Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais. **Uningá Review**, v. 20, n. 1, p. 98–102, 2014.
- 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.

- SEVERCAN, F.; SAHIN, I.; KAZANCI, N. Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes-evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1668, n. 2, p. 215–222, 2005.
- SHARMA, A. et al. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 3, p. 308–313, 2017.
- SILVA, T. M. DA et al. O Mercado de Amêndoas de *dipteryx odorata* (Cumaru) no Estado do Pará. **Floresta**, v. 40, p. 603–614, 2010.
- SILVA, L. S. et al. Encapsulation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* essential oils in gelatin nanoparticles: a possible sustainable control tool of *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2018a.
- SILVA, V. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. **Food Control**, v. 92, n. May, p. 516–522, 2018b.
- SLINKARD AND SINGLETON, K. SLINKARD, V. L. S. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, 1977.
- SOUZA, C. N. DE; ALMEIDA, A. C. DE; MARTINS, E. R. Atividade Antimicrobiana De Plantas Medicinais Do Cerrado. **Revista Unimontes Científica**, v. 19, n. 2, p. 51–61, 2017.
- SOUZA, M. V. et al. REVISÃO SOBRE A AQUISIÇÃO GRADUAL DE RESISTÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* AOS ANTIMICROBIANOS. **Revista De Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, p. 27–36, 2005.
- SUTHAR, S.M.; RATHVA, A. R. DEVELOPMENT OF LIPOSOMAL FORMULATION : FROM FORMULATION TO STERILIZATION. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. March, p. 1561–1571, 2019.
- TAVARES, E.S. L.S. JULIÃO, D. LOPES, H.R. BIZZO, C.L.S. LAGE, S. G. L. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 1, p. 1–5, 2005.
- TAVARES, I. B.; MOMENTÉ, V. G.; NASCIMENTO, I. R. DO. *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agrônômicos. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 4, n. 1, p. 204–220, 2011.
- THE, H. A. S. et al. Nunes-Correia, Ramalho-Santos, Pedrosa de Lima - 1998 - Sendai virus fusion activity as modulated by target membrane components. v. 25, n. 6, p. 1–10, 2002.

- THIPYAPONG, P.; HUNT, M. D.; STEFFENS, J. C. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, v. 220, n. 1, p. 105–117, 2004.
- TIMOSZYK, A.; GDANIEC, Z.; LATANOWICZ, L. The effect of polysialic acid on molecular dynamics of model membranes studied by ³¹P NMR spectroscopy. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 25, n. 1–3, p. 142–145, 2004.
- TOFIÑO-RIVERA, A. et al. Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, n. September, p. 749–754, 2016.
- VOLL, F.; VENTURA, C. Etiologia E Terapia Das Endocardites Bacterianas Em Cães - Revisão. p. 145–150, 2011.
- YOUSEFI, M. et al. Thymol as a new anesthetic in common carp (*Cyprinus carpio*): Efficacy and physiological effects in comparison with eugenol. **Aquaculture**, v. 495, n. 2017, p. 376–383, 2018.
- ZHENG-CUIMING; TENG-BING; GAO-FENGI; WUZONGPU; ZHENG-CM; TENG-B; GAO-FL; WU-ZP. Studies on the changes of superoxido dismutase, peroxidase and poliphenol oxidase in seed coat of soybeans after infection with soybean mosaic virus. **Scientia-Agricultura Sinica**, v. 32, p. 99–101, 1999.