



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
CAMPUS MORRO DO CRUZEIRO  
ESCOLA DE FARMÁCIA  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Nectandra nitidula* NEES & MART. PARA UTILIZAÇÃO EM  
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

**Thaís Bevilacqua**

**OURO PRETO**

**2022**

Thaís Bevilacqua

Avaliação da atividade biológica do óleo essencial de *Nectandra nitidula* Nees & Mart. para utilização em formulações farmacêuticas

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos

Ouro Preto

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

B571a Bevilacqua, Thais.

Avaliação da atividade biológica do óleo essencial de *Nectandra nitidula* Nees & Mart. para utilização em formulações farmacêuticas. [manuscrito] / Thais Bevilacqua. - 2022.

83 f.: il.: color.. + Quadros.

Orientador: Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos.  
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto.  
Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. *Nectandra nitidula*. 2. Essências e óleos essenciais. 3. Produtos com ação antimicrobiana. 4. Nanotecnologia. I. Santos, Orlando David Henrique dos. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 665.52

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
REITORIA  
ESCOLA DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Thaís Bevilacqua**

### **Avaliação da atividade biológica do óleo essencial de *Nectandra nitidula* para utilização em formulações farmacêuticas**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutica

Aprovada em 15 de julho de 2022

#### Membros da banca

Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos - orientador - Universidade Federal de Ouro Preto  
Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza - Universidade Federal de Ouro Preto  
MSc. Viviane Flores Xavier - Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 10/10/2022



Documento assinado eletronicamente por **Orlando David Henrique dos Santos, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 10/10/2022, às 08:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0410002** e o código CRC **AF7190DE**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.014002/2022-97

SEI nº 0410002

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000  
Telefone: (31)3559-1069 - www.ufop.br

Dedico este trabalho às mulheres de  
minha vida que, mesmo longe, têm se  
mantido por perto: Minha mãe, Rita e  
minhas avós, Márcia e Maria

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus e às forças, entidades e mentores que me guiam;

À minha família, sempre presente: Edmir, Murilo, Edméa, Régis, Simone, Regina e Cassiano;

À Universidade Federal de Ouro Preto e à Escola de Farmácia pelo ensino de qualidade e oportunidades;

Ao professor Orlando pela orientação e paciência;

Ao Programa de Incentivo à Pesquisa da UFOP (PIP/UFOP) pelo apoio;

Ao laboratório de Fitotecnologia pela acolhida e auxílio, em especial Larissa, Rosália, Luciana e Viviane;

À FAPEMIG CDS – APQ 01510-14 e ao projeto “Manutenção do inovador sistema analítico AF2000 “Asymmetric Flow Field Flow Fractionation” pertencente ao Laboratório Multiusuário do CiPharma-UFOP” pelo aparelho AF4/Zetasizer;

Ao professor Luiz Fernando por ceder as amostras de plantas e micro-organismos;

À professora Silvana e ao LBTM pelo tempo dispendido me auxiliando;

À professora Maria Cristina, por ter me dado a primeira oportunidade no campo de pesquisa e extensão na área de plantas medicinais;

Felícia, Drago, Jú, Veveta, Glau e Landesa, obrigada por estarem comigo neste longo processo, nos momentos de alegria e desespero.

“Você é do tamanho do seu sonho.

Faz o certo, faz a sua

...

Cabeça erguida, olhar sincero, tá com medo de que?

Nunca foi fácil, junta seus pedaços e desce pra arena

Mas lembre-se: aconteça o que aconteça, nada como um dia após o outro dia”

Racionais MC's – Sou + Você

## Resumo

O uso e estudo documentado de propriedades de óleos essenciais remete às civilizações egípcia e chinesa. Desde então, têm sido utilizados principalmente para medicina e cosmética, devido a propriedades terapêuticas que possam vir a apresentar. Um dos usos mais conhecidos e divulgados foi durante a Peste Negra, em que os médicos possuíam misturas de óleos essenciais nos bicos das máscaras para proteção e disfarçar o odor. Devido suas propriedades antibacterianas já conhecidas, são amplamente utilizados. As pesquisas sobre novos óleos essenciais e suas propriedades avançam a cada dia, sendo esta, mais uma. O objetivo principal desta pesquisa é a análise de propriedades microbiológicas do óleo essencial da planta *Nectandra nitidula* Nees & Mart., planta presente na América do Sul. A pesquisa se deu pela obtenção do óleo essencial da planta por meio de destilação por arraste a vapor. A pesquisa com os micro-organismos selecionados foi realizada por meio de teste de Sensibilidade em Disco e confirmando a presença de atividade antimicrobiana, uma nanoformulação foi preparada com 5% do óleo essencial obtido e por meio de aquecimento das fases aquosa e oleosa com resfriamento sob agitação constante até temperatura ambiente para futuras utilizações em formulações farmacêuticas. Dos micro-organismos testados durante a pesquisa, apenas *Staphylococcus epidermidis* apresentou sensibilidade na presença do óleo essencial.

**PALAVRAS CHAVE:** *Nectandra nitidula*; Óleo Essencial; Propriedades Antimicrobianas; Nanoformulação.

## **Abstract**

The study and use of properties of essential oils are from the Egyptian and Chinese civilizations. Since then, they have been used specially for medicine and cosmetics, because of their therapeutical properties that they can present. One of the most famous uses is the use of the essential oils during the black Plague, when the doctors used to put some mixed essential oils on the beaks of their masks both for protection and to odor disguise. Because of the antibacterial properties of the essential oils that are known, they are widely used. The researches about new essential oils and their properties are increasing and the main objective of this project is the analysis of microbiological properties of the essential oil of *Nectandra nitidula* Nees & Mart., a plant that is very present in South America. The research started with the production of the essential oil by steam distillation. The antimicrobial research was performed by a disk sensibility test and, in case of presence of activity on the Petri dishes, a nanoformulation was prepared using 5% of the essential oil and by heating both aqueous and oily phases and cooling them together by vigorous mixing them until ambient temperature to future utilizations in pharmaceutical formulations. Only *Staphylococcus epidermidis* presented sensibility in the presence of the *Nectandra nitidula*'s essential oil

**PALAVRAS CHAVE:** *Nectandra nitidula*; Essential oil; Microbian properties; Nanoformulation.

## Sumário

1. Introdução .....	1
2. Objetivos .....	4
2.1. Objetivo Geral .....	4
2.2. Objetivos específicos .....	4
3. Revisão de Literatura .....	5
3.1. A planta estudada .....	5
3.1.1. A família Lauraceae .....	5
3.1.2. O gênero <i>Nectandra</i> .....	6
3.1.3. A espécie <i>N. nitidula</i> .....	7
3.2. Óleos essenciais .....	8
3.2.1. Definição, extração, usos e propriedades .....	8
3.2.2. História dos óleos essenciais .....	9
3.2.3. Composição do óleo essencial e pesquisa sistemática .....	12
3.2.4. Utilização de óleos essenciais .....	13
3.2.5. Estudos envolvendo óleos essenciais .....	14
3.3. Micro-organismos .....	15
3.3.1. <i>Escherichia coli</i> .....	19
3.3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	20
3.3.3. <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	21
3.3.4. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	23
3.4. Teste de Sensibilidade em Disco .....	24
3.5. Nanoformulação .....	25
4. Materiais .....	27
4.1. Planta Escolhida .....	27
4.2. Vidrarias e Plásticos .....	27

4.3. Equipamentos .....	27
4.4. Reagentes.....	28
5. Metodologia.....	29
5.1. Manuseio da planta <i>Nectandra nitidula</i> .....	29
5.2. Pesquisa com micro-organismos .....	30
5.3. Preparo de nanoformulação.....	32
6. Resultados .....	35
6.1. Óleo Essencial .....	35
6.2. Micro-Organismos .....	37
6.2.1. Leitura dia 30/11/2021 .....	37
6.2.2. Leitura dia 04/12/2021 .....	42
6.2.3. Leitura dia 06/12/2021 .....	49
6.2.4. Leitura dia 10/12/2021 .....	50
6.2.5. Leitura dia 14/12/2021 ( <i>S. epidermidis</i> e <i>S. aureus</i> ).....	55
6.3. Formulação nanopartícula.....	57
6.3.1. Formulações 1 a 4 .....	57
6.3.2. Formulações 4.1 e 4.2 .....	58
7. Discussão.....	59
8. Conclusão .....	64
9. Considerações finais.....	64
10. Referências .....	65

## 1. Introdução

O uso de plantas medicinais e seus derivados não possui uma data correta de início de utilização, porém acredita-se que seu princípio foi junto ao desenvolvimento da humanidade (FIRMO *et al.*, 2011).

Alguns pesquisadores propõem datas relacionadas a registros históricos e arqueológicos, como DUARTE (2006), que infere que o primeiro registro ocorreu no ano de 500 antes de Cristo (a.C.), na China, porém foram encontrados documentos datados de 2800 a.C. (o manuscrito “Ebers Papyrus”, de origem egípcia), de 60.000 anos atrás (registros arqueológicos encontrados do atual Iraque) e datados de 17.300 anos atrás (desenhos encontrados em uma caverna na cidade de Lascaux, França) (BUCKLE, 2014). Além destes supracitados, VALE (2002) infere que o primeiro registro de plantas medicinais e seus usos foi entre 2838-2698 a.C. em um documento escrito por um imperador chinês de nome Shen Nung (FIRMO *et al.*, 2011; TRANCOSO, 2013). Com estas informações e diferentes considerações, é difícil definir uma data de início.

Além dos egípcios, chineses e persas, civilizações como a Índia, Tibet, Uzbequistão e também europeus e nativos sul e norte americanos também possuem registros do uso de medicamentos naturais e seus derivados, como extratos, tinturas e óleos essenciais (OE) (BUCKLE, 2014)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 85% da população mundial (em especial países em desenvolvimento) faz uso de plantas medicinais, seja por questões econômicas ou pela substituição da medicina convencional pela alternativa (BADKE *et al.*, 2012; BATTISTI *et al.*, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; SOUZA; RODRIGUES, 2016). Além disso, muitas vezes o tratamento com plantas medicinais e fitoterápicos pode representar a única opção para algumas comunidades e grupos étnicos (MACIEL *et al.*, 2002).

O Brasil possui entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, conforme a Convenção da Diversidade Biológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006) e, dentro desta porcentagem, há aproximadamente 55.000 espécies vegetais presentes em solo brasileiro, sendo apenas 46.355 delas conhecidas e estudadas

(BARREIRO; BOLZANI, 2009; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, [s. d.], 1993).

Em sua extensão, a biodiversidade brasileira é considerada fonte de substâncias biologicamente ativas (BARREIRO; BOLZANI, 2009; FERREIRA, 2013) e tal motivo aliado ao desconhecimento de muitas espécies vegetais é um importante motivo para sua preservação (BARREIRO, 2019). Devido à diversidade étnica aliada à biodiversidade brasileira, o Brasil possui o potencial necessário para que pesquisas sejam realizadas e resultem em tecnologias farmacêuticas, medicamentos fitoterápicos e terapias apropriadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Uma enorme gama de metabólitos já foi obtida, muitos apresentando atividades farmacológicas e biológicas, com potencial de desenvolvimento de protótipos cosméticos e farmacêuticos (JOLY *et al.*, 2011). Dos produtos naturais mais comercializados, estão os óleos essenciais ou voláteis (JOLY *et al.*, 2011).

Os óleos essenciais são produzidos a partir do metabolismo secundário dos vegetais e são uma mistura complexa de compostos em concentrações diferentes, variando entre 20 e 60 de cada composto por óleo essencial (TRANCOSO, 2013; WOLFFENBÜTTEL, 2007). Embora apresente esta grande variedade de compostos, apenas dois ou três se destacam em um óleo essencial, sendo estes os determinantes das propriedades daquele óleo (TRANCOSO, 2013; WOLFFENBÜTTEL, 2007). Os óleos voláteis apresentam grande espectro de ação farmacológica, podendo atuar de diferentes formas, como anti-inflamatórios, cicatrizantes, antimicrobianos e analgésicos (AZEREDO *et al.*, 2014).

LORENZI (1998) descreve, em seu livro, que a espécie *Nectandra nitidula* Nees & Mart. é mais conhecida por canela-do-mato ou canela amarela, mas também pode ser chamada canela-de-mata-ciliar ou canela-do-córrego. Pode ser encontrada em matas ciliares e em matas secundárias em altitudes até 1300m, desde o estado do Paraná até a Bahia. A árvore, que varia entre 4 e 8 metros e floresce entre setembro e novembro, pertence à família Lauraceae e se encontra entre os 52 gêneros e 3000 espécies da mesma, sendo destes, encontrados no Brasil, 22 gêneros e aproximadamente 390 espécies (ALVES; SARTORI, 2009;

ROHWER, J. G., 1993). É uma árvore lenhosa, cuja madeira é utilizada principalmente em construção civil (LORENZI, 1998).

É uma planta que apresenta poucos estudos sobre a mesma e ausência de estudos sobre a avaliação microbiológica de seus metabólitos, em especial seu OE. Outro ponto a ser citado como importante é a atual problemática apresentada pela resistência adquirida por bactérias devido ao uso irracional de medicamentos antibióticos, podendo gerar uma bactéria resistente a diferentes antimicrobianos, conhecida como “superbactéria” (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007; COSTA, 2019). Com isso, a pesquisa da atividade antimicrobiana do OE da *N. nitidula* se dá como uma alternativa natural que pode apresentar atividade semelhante aos antimicrobianos tradicionais. O baixo custo de obtenção do OE por meio do processo de destilação por arraste a vapor também deve ser levado em consideração como uma possibilidade de diminuição do valor do produto final, podendo tal produto ser uma formulação farmacêutica com potencial uso cosmético.

Considerando as propriedades farmacológicas dos óleos essenciais, a baixa quantidade de estudos envolvendo a planta citada e sua presença em solo brasileiro, o objetivo do presente trabalho é avaliar a atividade biológica do óleo essencial de *Nectandra nitidula* para futura utilização em formulações farmacêuticas.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Nectandra nitidula* NEES & MART. para utilização em formulações farmacêuticas.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Coletar amostras de folhas da planta *Nectandra nitidula*;
- Destilar o óleo essencial das folhas da planta *N. nitidula*;
- Avaliar atividade do óleo essencial por meio de análise microbiológica;
- Desenvolver formulação nanoestruturada contendo o óleo essencial.

### 3. Revisão de Literatura

#### 3.1. A planta estudada

##### 3.1.1. A família Lauraceae

Conhecidas como “canelas”, a família de plantas angiospermas chamada Lauraceae é considerada pantropical, que significa que sua distribuição cobre as regiões dos trópicos continentais. Se encontram presentes em regiões tropicais e subtropicais (ROHWER, J. G., 1993), especialmente na América do Sul e Ásia, porém podendo aparecer em Madagascar, África Central e Austrália (WERFF; RICHTER, 1996)

A família apresenta cerca de 52 gêneros e aproximadamente 3000 espécies (ROHWER, J. G., 1993), representados, em sua maioria, por árvores e arbustos (ALVES; SARTORI, 2009). Dos citados, podem ser encontrados no Brasil 22 gêneros e 390 espécies, presentes em florestas pluviais, restingas e no Cerrado brasileiro (ALVES; SARTORI, 2009; BAITELLO *et al.*, 2003; BARROSO *et al.*, 2002).

MARQUES (2001) cita que os primeiros usos de espécies da família Lauraceae são datados de 2800 AC, da Grécia antiga. A família se destaca pela importância econômica. Embora seja utilizada pelas indústrias para fabricação de produtos, variando entre marcenaria, construção civil, indústria papelreira, reflorestamento de matas ciliares, perfumaria e medicina popular, seu uso se restringe principalmente a comunidades tradicionais, pois elas detêm o conhecimento empírico do uso das plantas desta família.

As plantas da família Lauraceae apresentam o óleo essencial armazenado em células secretoras encontradas na folha, casca e lenho (MARQUES, 2001). Uma planta da família Lauraceae produtora de óleo essencial muito conhecida é a *Cinnamomum canphora* (L), a cânfora, planta utilizada e conhecida desde a Grécia antiga. Também está presente a *Lindera benzion* (L) Blume, o benjoin (MARQUES, 2001)

### **3.1.2. O gênero *Nectandra***

O gênero *Nectandra* foi descrito pela primeira vez por Rottboel, no ano de 1778, com base em anotações do pesquisador Rolander (ROHWER, J. G., 1993), reconhecida inicialmente como um subgênero de *Ocotea* (KOSTERMANS, 1957) pelo fato de, filogeneticamente falando, se assemelhar às espécies neotropicais de *Ocotea* (CHANDERBALI; WERFF; RENNER, 2001). Após alguns anos, *Nectandra* foi reconhecida como gênero, por ALLEN (1966) (ALVES; SARTORI, 2009).

O nome *Nectandra* foi dado pelo autor após uma interpretação errônea em que os estames seriam glândulas nectaríferas (ROHWER, J. G.; KUBITZKI, 1992)

Muitos gêneros de Lauraceae não podem ser identificados apenas com caracteres vegetativos e um exemplo disso é a *Nectandra* (ROHWER, J. G., 1993; ROHWER, Jens G; RICHTER; WERFF, 1991). É necessário material florido para identificar corretamente e, muitas chaves de identificação se baseiam em caracteres florais (WERFF, 1991). Então é possível realizar a caracterização do gênero *Nectandra* por meio de suas flores, sendo elas trímeras, bissexuadas, com papilas que cobrem a face interna das tépalas e a presença de nove estames férteis com quatro locelos dispostos em arco (ROHWER, J. G., 1993).

*Nectandra* é o segundo maior gênero de Lauraceae no novo mundo (ALVES; SARTORI, 2009), com 114 espécies conhecidas, sendo 43 das mesmas encontradas em solo brasileiro, em especial em biomas de Mata Atlântica e Floresta Amazônica (BAITELLO *et al.*, 2003). É restrito às Américas tropical e subtropical e, grande parte das 144 espécies são encontradas entre os trópicos de Câncer e Capricórnio (WERFF, 1991).

Planta lenhosa, de grande representatividade e ampla distribuição, fornecem madeira de boa qualidade e algumas espécies podem ser utilizadas na extração de óleos essenciais (ALVES; SARTORI, 2009). Por causa de sua exploração exacerbada, medidas de proteção com o plantio em áreas de recuperação são utilizados (ALVES; SARTORI, 2009; QUINET; ANDREATA, 2002).

O desenvolvimento do gênero se dá em ambientes úmidos, verdes, planícies florestais montanhosas e poucas espécies se encontram em habitats diferentes

do citado (ROHWER, J. G., 1993). O maior centro de diversidade se encontra nos Andes e Amazônia peruana. O Sudeste brasileiro é tido como o segundo maior centro de diversidade de *Nectandra* (ROHWER, J. G., 1993).

Quanto ao uso medicinal, embora o gênero mais utilizado da família Lauraceae seja o *Ocotea*, o gênero *Nectandra* apresenta dois representantes, sendo *N. picharim* (para problemas gástricos) e a *N. rodiaei* (como antipirético e tônico) (MARQUES, 2001)

### **3.1.3. A espécie *N. nitidula***

A planta *Nectandra nitidula* Nees & Mart. é uma pequena árvore que pode alcançar 8 metros de altura, apresenta tronco com diâmetro variando entre 20 a 30 cm, sua copa é rala e suas folhas se apresentam alternadamente (LORENZI, 1998). Pode ser encontrada entre os estados da Bahia até o Paraná em matas ciliares, áreas de Cerrado, florestas estacionais e semidecíduais e prefere solos úmidos e/ou encharcados (BAITELLO *et al.*, 2003; LORENZI, 1998). Pode ser utilizada como planta ornamental para jardinagem. Sua madeira tem valor comercial e sua casca (aromática) é utilizada para fazer chá (LORENZI, 1998).

BAITELLO *et al.* (2003) relatam que quanto a sua morfologia, tem-se que pecíolo, pedicelo, hipanto e cúpula do fruto são referidos como avermelhados. Quase todos os meses do ano apresentam flores, mas apresenta em maior quantidade nos meses de setembro e outubro. Seus frutos se apresentam nos meses finais e iniciais do ano. É possível diferenciar a espécie *N. nitidula* pela papiliosidade reduzida no ápice curto, conectivo dos estames de séries I e III.



Figura 1 - Galho de *Nectandra nitidula* com folhas, flores e frutos, sendo possível observar as folhas e suas duas faces

## 3.2. Óleos essenciais

### 3.2.1. Definição, extração, usos e propriedades

Óleos essenciais ou óleos voláteis são metabólitos secundários aromáticos e voláteis compostos por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides simples produzidos pelas plantas, juntamente com saponinas, alcaloides e flavonoides como metabólitos (MONTEFUSCOLI *et al.*, 2014; WOLFFENBÜTTEL, 2007). São secretados por glândulas presentes em diversas partes dos vegetais, como flores, folhas, cascas dos frutos, cascas de árvores, resinas da casca, raízes e sementes. São utilizados pelos vegetais para atração de polinizadores e autodefesa (TRANCOSO, 2013; WOLFFENBÜTTEL, 2007), assim como para evitar predadores, repelente natural de insetos ou para inibir a germinação de espécies competidoras por perto, por exemplo no caso do eucalipto (WEISS, 1997). O local onde o OE fica encapsulado é chamado de tricoma. Estes podem ser naturalmente rompidos pela planta para que o óleo seja liberado ou intencionalmente, por processos físicos ou mecânicos (WOLFFENBÜTTEL, 2007).

A extração pode ocorrer por diferentes métodos, a citar alguns: extração por arraste a vapor, hidrodestilação, prensagem e enfleurage (WOLFFENBÜTTEL, 2007). Seus usos podem ser em diversas áreas, como na saúde, perfumaria e cosmética, alimentícia, aromatização ambiental, domissanitária e têxtil (WOLFFENBÜTTEL, 2007). Embora em sua maioria os vegetais possuam óleos essenciais, nem todos os óleos possuem propriedades farmacológicas ou aroma agradável (TRANCOSO, 2013).

É relatado que a primeira pessoa a realizar extração de óleo essencial foi o físico árabe Avicena (508-1073), extraíndo o óleo de rosas, devido ao grande conhecimento difundido e aperfeiçoado pelos árabes, durante as Cruzadas, sobre aparelhos e técnicas de destilação (TRANCOSO, 2013). Embora haja este relato, no ano de 1975, um aparelho de terracota datado de 3000 a.C. foi encontrado no Vale do Indo (noroeste do sul da Ásia), indicando a utilização do método anteriormente (BAŞER; BUCHBAUER, 2020)

De acordo com SCHNAUBELT (2011), a atividade antibacteriana dos OE tem sido continuamente estudada desde o ano de 1880 e no livro de Gattefossé há

uma lista de referências de estudos que se iniciaram em meados de 1800. O livro “Traité de Phytothérapie et d’aromathérapie” é um compilado de estudos realizado por Paul Belaiche em 1970 sobre a atividade antimicrobiana dos óleos voláteis.

Além de atividade antimicrobiana, os óleos essenciais podem apresentar atividade antiviral, antifúngica, anti-inflamatória, sedativa, analgésica, cicatrizante, calmante e antidepressiva (SCHNAUBELT, 2011; WOLFFENBÜTTEL, 2007).

### **3.2.2. História dos óleos essenciais**

Em seu livro, SCHNAUBELT (2011) explana sobre o termo “essência”, cuja origem é termo “quintessência” que, para Platão (428 a.C.-328 a.C.), representa do que o Cosmos é feito. Durante a Idade Média, tornou-se o quinto elemento além dos outros quatro previamente conhecidos: fogo, água, terra e ar. Porém com o passar do tempo, as palavras “essência”, “quintessência” e “óleo essencial” passaram a representar os vários graus de refinamento associados à destilação.

Pela falta de comprovação do uso, não se há uma data correta de início da utilização de plantas medicinais e óleos essenciais, mas existem registros do antigo Egito, da Idade Média e, o mais antigo, da região do atual Iraque (BUCKLE, 2014; FIRMO *et al.*, 2011; LIETAVA, 1992; SOLECKI, 1963, 1967; WOLFFENBÜTTEL, 2007).

A caverna Shanidar, localizada a cerca de 765 metros do sopé da montanha Baradost (cordilheira de Zagros), nordeste do Iraque (POMEROY *et al.*, 2020; SOLECKI, 1963) é o local onde foi encontrado a mais antiga presença de aglomerados de pólen, datados de 60.000 a.C., em um túmulo, de Shanidar IV Neandertal (LIETAVA, 1992). Embora não se tenha a confirmação do motivo das flores, existem duas teorias, sendo uma delas o uso de plantas medicinais e suas propriedades durante a morte (LIETAVA, 1992) e a outra apenas pela estética durante o ritual funerário (SOLECKI, 1963). Este último autor acabou corrigindo seu ponto de vista após algum tempo, apontando o potencial medicinal das plantas identificadas e afirmando em sua conclusão que tal coincidência abre

oportunidades para especulações sobre “a extensão do espírito humano nos Neandertais” (LIETAVA, 1992; SOLECKI, 1967). As plantas foram identificadas pelo pólen encontrado e apresentam propriedades tais como purgativa (*Senecio vulgaris* Linn.), diurética (flores do gênero *Muscari*), estimulante cardíaco (*Ephedra alata* Decne), antiespasmódica, alívio para dores de dente e inflamações (*Althaea rosea* Linn.) (SOLECKI, 1967).

Há autores que aceitam que o livro chinês “Shen Nung” é o mais antigo do mundo, datado de 2700 a.C., contendo citações do gengibre e ópio (FIRMO *et al.*, 2011; TRANCOSO, 2013; WEISS, 1997). Há também um documento datado de 2000 a.C. escrito em sânscrito, pelos hindus, documentando o uso de óleos essenciais como de canela, gengibre e sândalo, época em que já se havia um conhecimento rudimentar sobre aparelhagem de destilação já utilizado pelas civilizações persa e egípcia (TRANCOSO, 2013; WEISS, 1997).

Outros autores aceitam que um dos documentos médicos mais importantes do Egito, datado de 1500 a.C. é o mais antigo (BAŞER; BUCHBAUER, 2020; BUCKLE, 2014). Nomeado de “Papiro Ebers” (Papyrus Ebers) após sua compra em 1872 por um pesquisador alemão de nome G. Ebers, o documento contém aproximadamente 700 fórmulas e remédios, incluindo produtos vegetais e plantas aromáticas como anis, coentro, tomilho e mirra (BAŞER; BUCHBAUER, 2020).

O físico grego Hipócrates (460 – 377 a.C.) citou a eficácia de aproximadamente 200 plantas medicinais em sua coletânea de tratados “Corpus Hippocratium”, prescrevendo fumigações perfumadas e fomentações, sendo um dos mais famosos o de nome “Megaleion”, composto por mirra, canela e cássia (BAŞER; BUCHBAUER, 2020; WEISS, 1997). WEISS (1997) também cita Heródoto, contemporâneo de Hipócrates, foi o primeiro a registrar sobre a destilação da terebentina. Seu livro proveu informações sobre perfumes e aromáticos então utilizados no Oriente Médio.

BAŞER; BUCHBAUER (2020) e WEISS (1997) abordam em seus documentos que entre os anos 40-60 depois de Cristo (d.C.), viveu o botânico e físico grego de nome Pedanius Dioscorides, praticante de medicina na Roma antiga e responsável pela escrita do livro composto por 5 volumes “De Materia Medica”.

Durante suas viagens, descreveu aproximadamente 600 plantas medicinais e seus respectivos remédios utilizados por romanos e gregos, podendo então a coletânea ser considerada precursora das farmacopeias modernas.

Também no livro de BAŞER; BUCHBAUER (2020) é contado sobre o processo de destilação, que o tratado “Liber de Arte Distillandi de Compositis” escrito pelo físico Hieronimo Brunschwig (1450-1512) descreve o processo de destilação de diferentes maneiras. A destilação era utilizada para a preparação de águas aromáticas e a porção que aparecia na superfície (os até então desconhecidos óleos essenciais) eram tidos como produtos indesejáveis. O físico e alquimista Paracelso (1493-1541), acreditava que a destilação liberava a parte mais desejável da planta, a “quintessência”, o que separava a parte essencial da não essencial.

Em 1558, o documento “Magiae naturalis sive de miraculis rerum naturalium” é escrito pelo italiano Giovani Battista dela Porta (1535-1615), compilando estudos de pesquisadores antigos e modernos à época sobre separação de OE (TRANCOSO, 2013).

O termo aromaterapia foi criado por René-Maurice Gattefossé (1881-1950) em 1920 (ANDREI; COMUNE, 2005). Ela foi descoberta por causa de um acidente em seu laboratório, onde ele trabalhava e se queimou com uma explosão que ocorreu. Existem várias versões sobre esta história: uma fala que Gattefossé confundiu a tina de água com uma contendo óleo essencial de lavanda e mergulhou seu braço, o que acalmou sua pele e auxiliou na cicatrização (PAGANINI; SILVA, 2014; TRANCOSO, 2013). A outra diz que após alguns dias do acidente, os machucados inflamaram e apresentaram gangrena gasosa, porém com apenas um uso de óleo essencial de lavanda, a infecção parou (BUCKLE, 2014). Mas este acontecimento, independente da história como seja contada, levou Gattefossé a pesquisar sobre as propriedades dos óleos essenciais e seus usos. BUCKLE (2014) comenta que soldados da 1ª Guerra Mundial (G.M.) foram seus pacientes, em quem foram utilizados OE, por exemplo de camomila, limão e cravo, para auxiliar no tratamento de feridas obtidas em batalha. Além disso, até a 2ª G.M., OE foram utilizados para esterilização de instrumentos cirúrgicos e desinfecção de feridas. Em 1937, o livro “Aromatherapy” (Aromaterapia) foi publicado por Gattefossé. O ponto principal

do livro era demonstrar as propriedades curativas dos OE e explicar as mesmas como qualidades das moléculas dos mesmos. Em 1993, o manuscrito foi descoberto por Jeanne Rose e traduzido para o inglês por Louise Davies (BUCKLE, 2014; SCHNAUBELT, 2011).

### **3.2.3. Composição do óleo essencial e pesquisa sistemática**

O óleo volátil tem sua estrutura química composta basicamente por hidrocarbonetos e oxigênios, que podem gerar diferentes funções orgânicas, como álcoois, cetonas e ácidos carboxílicos (WOLFFENBÜTTEL, 2007). Com isso, há a possibilidade de formação de uma enorme gama de substâncias que variam em propriedades e funções bioquímicas, podendo chegar a mais de 300 substâncias para cada óleo essencial, mas, destas, geralmente apenas 2 ou 3, por sua predominância, definem a atividade do óleo (TRANCOSO, 2013; WOLFFENBÜTTEL, 2007). A atuação dos OE depende não apenas dos componentes majoritários da mistura final (que correspondem cerca de 20 a 80% do total), mas também de componentes minoritários e os que estão presentes a nível de traço (cerca de 0,01%) (WOLFFENBÜTTEL, 2007).

A composição dos OE pode ser afetada por algumas variáveis, como o método de extração utilizado, o momento de desenvolvimento da planta, local de plantio, horário e dia da colheita e, ainda assim, mesmo após extraído, pode sofrer alterações caso reaja com o vasilhame em que foi acondicionado, com a luz do ambiente e até mesmo entre seus próprios constituintes (WOLFFENBÜTTEL, 2007).

TRANCOSO (2013) reforça que os óleos essenciais diferem de óleos chamados fixos por causa de sua volatilidade composição e fonte de obtenção. Os óleos fixos tem em sua composição substâncias lipídicas, de menor volatilidade quando comparados aos hidrocarbonetos e oxigênios presentes nos OE, além disso são obtidos de sementes como canola, girassol e soja, conhecidas como oleaginosas.

A primeira pesquisa sistemática dos constituintes dos óleos essenciais pode ser atribuída ao químico francês M.J. Dumas (1800-1884), escreveram BAŞER; BUCHBAUER (2020), que analisou hidrocarbonetos e oxigênios, além de

constituintes contendo enxofre e nitrogênio. Seus resultados foram publicados em 1833.

BAŞER; BUCHBAUER (2020) também escreveu que, sobre este assunto, as investigações mais importantes foram performadas pelo assistente do químico alemão Kekule, de nome O. Wallach. Ele percebeu que vários terpenos descritos por diferentes nomenclaturas eram quimicamente iguais. Ele e sua equipe tentaram então isolar os constituintes individuais dos OE e estudar suas propriedades, realizando destilações fracionadas com reagentes como ácido clorídrico, bromina e cloreto de nitrosila. A ocorrência de hidrocarbonetos nos OE com a fórmula C<sub>10</sub>H<sub>16</sub> era bastante frequente e conhecida, sendo nomeado por Kekule como terpenos (devido sua ocorrência no óleo de terebentina). No ano de 1891, Wallach caracterizou os terpenos pineno, canfeno, limoneno, dipenteno, felandreno, terpinoleno, fencheno e silvestreno. E entre 1884 e 1914, ele escreveu aproximadamente 180 artigos que estão resumidos em seu livro “Terpene und Campher” (Wallach, 1914), compilando todo o conhecimento sobre terpenos da época.

#### ***3.2.4. Utilização de óleos essenciais***

Os óleos essenciais são muito conhecidos e utilizados pela aromaterapia, apresentando diversas maneiras de uso, podendo ser absorvidos pelo corpo humano por meio da inalação e absorção cutânea e, menos recomendavelmente, ingestão oral (PAGANINI; SILVA, 2014; WOLFFENBÜTTEL, 2007). Quando inalados ativam o sistema límbico e produzem os efeitos esperados. Quando absorvidos pela pele, atingem a corrente sanguínea e também produzem os efeitos desejados (ANDREI; COMUNE, 2005). De ambas as maneiras, atuam no corpo de maneira farmacológica, psicológica e fisiológica (PAGANINI; SILVA, 2014; TSUCHIYA; NASCIMENTO, 2002).

Para uso tópico, alguns cuidados devem ser tomados dependendo do OE, por exemplo a exposição ao sol após uso de óleos de cítricos como limão e laranja doce por causa de furanocumarinas (presentes após extração por prensagem) ou o uso tópico do OE puro de canela diretamente na pele, devido ao composto

cáustico cinamaldeído, ambos causando queimaduras cutâneas (ALBA; SANTOS, 2018; KÖNIG, 2020; PAGANINI; SILVA, 2014; WOLFFENBÜTTEL, 2007).

WOLFFENBÜTTEL (2007) ressalta que os metabólitos dos óleos podem ser detectados no sangue, urina, suor e ar expirado, indicando que o mesmo interagiu com o organismo. Deve-se, então, ficar atento com intoxicações e reações aos componentes desse, como as supracitadas queimaduras ou alergias.

### **3.2.5. Estudos envolvendo óleos essenciais**

WOLFFENBÜTTEL (2007) explica que diferentes metodologias são utilizadas para pesquisas com os óleos, seja *in vitro* ou *in vivo*. No segundo caso, os pacientes são divididos entre “grupo exposto ao tratamento com OE”, “grupo exposto ao placebo (em que a formulação é realizada sem o óleo essencial)” e “grupo exposto ao tratamento com medicação alopática”.

Embora os OE tenham sido utilizados desde a antiguidade, a farmacologia não consegue demonstrar a eficácia dos mesmos. SCHNAUBELT (2011) aponta que dois são os motivos principais, sendo um deles a dificuldade de relacionar um efeito específico à uma substância específica que esteja presente no óleo. É esperado que, após ministrada, uma certa quantidade da molécula da substância realize um efeito específico em um espaço de tempo definido previamente. Caso haja o aumento da quantidade da substância a ser ministrada, espera-se que o tempo de efeito aumente, assim como esse último seja diminuído caso a quantidade ministrada seja menor. O outro motivo é que é esperado pela farmacologia que os resultados obtidos consigam ser demonstrados em mecanismos de ação, que descrevam as atividades realizada após a substância ser administrada, além de locais onde a molécula realizará tais atividades citadas. O autor também reforça que com os OE há maior dificuldade de realizar tais pesquisas devido a quantidade de substâncias presentes em apenas um óleo, podendo a ação do mesmo resultar da contribuição de duas ou mais substâncias juntas. Caso as substâncias sejam testadas isoladamente, o efeito poderia ser anulado. Por exemplo, a lavanda é recomendada pela aromaterapia para uso em queimaduras, porém a farmacologia não a indica, pela falta de

definição de um princípio ativo que possa simular os efeitos do óleo essencial (SCHNAUBELT, 2011)

Embora a eficácia antibacteriana dos OE possa ser demonstrada em experimentos em placas de Petri, seu mecanismo não pode ser elucidado, diferentemente de antibióticos, por exemplo. Neste segundo caso é possível identificar um alvo bacteriano, enquanto no primeiro há atividade do OE em diferentes sistemas fisiológicos do micro-organismo simultaneamente, dificultando a identificação (SCHNAUBELT, 2011)

### **3.3. Micro-organismos**

TORTORA; FUNKE; CASE (2020) em seu livro, escrevem que a pele é a primeira linha de defesa do corpo humano, pois, quando intacta, é uma barreira física que o recobre e é praticamente impenetrável por patógenos. Devido a presença de secreções ácidas e pouca umidade, a pele se torna um ambiente inóspito, mas certas bactérias, como a *Pseudomona aeruginosa*, *Streptococcus aureus* e *S. epidermidis* fazem desta sua morada, colonizando-a. Além destas bactérias que vivem na pele, podem ser encontradas bactérias que vivem dentro de nossos órgãos, por exemplo *Helicobacter pylori*, que vive no estômago e a *Escherichia coli*, que vive no intestino grosso. Os autores também apontam que tais bactérias, em condições normais, vivem em relação de simbiose mutualística com o ser humano, em que há benefícios tanto para as bactérias quanto para o hospedeiro. Um exemplo desta relação é a *E. coli*, que, em troca dos nutrientes que o intestino provê para sua sobrevivência, ela sintetiza vitaminas K e do complexo B que são absorvidas pelo intestino e transportadas pelo corpo pela corrente sanguínea.

Porém, sob certas condições adversas, os autores TORTORA; FUNKE; CASE (2020) escrevem que caso haja feridas ou imunidade baixa, tais micro-organismos se tornam os chamados patógenos oportunistas. Tal classificação é dada porque em seu habitat natural, a bactéria é inofensiva, porém em outras situações, se torna uma ameaça ao corpo. Além de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, outras bactérias que podem ser chamadas patógenas oportunistas são *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus orais*.

Uma das classificações bacterianas é a Gram-positiva e Gram-negativa. BLACK; BLACK (2020) citam em sua obra que bactérias Gram-positivas apresentam um espesso envoltório celular formada por peptidoglicanos e que contém em sua composição ácido teoico, fixada na superfície externa da membrana celular. Apresentam também parede celular resistente, devido à alta pressão osmótica interna, que garante a não ruptura das mesmas quando expostas à baixa pressão osmótica dos líquidos corporais. Ainda, podem produzir enzimas extracelulares que atuam ao redor do micro-organismo. Não possuem membrana externa e nem espaço periplasmático.

Além disso, as autoras BLACK; BLACK (2020) definem bactérias Gram-negativas apresentando envoltório celular mais fino, porém de maior complexidade quando comparada à anterior. O mesmo é formado por peptidoglicanos em menor quantidade, polissacarídeos, proteínas e lipídeos. Diferentemente das Gram-positivas, apresenta membrana externa e espaço periplasmático, onde atuam as enzimas periplasmáticas produzidas por estas bactérias. A membrana externa forma a camada mais externa do envoltório celular do micro-organismo e é uma membrana em bicamada. Está ligada ao peptidoglicanos por lipoproteínas e serve como controle de transporte de proteínas advindas do meio em que a bactéria se encontra. Na membrana externa também é possível verificar a presença de porinas, proteínas que formam canais através desta. A membrana das bactérias Gram-negativas também auxilia em uma resistência maior a penicilinas, já que serve como barreira ao ataque do medicamento. A presença de endotoxinas na parede celular das mesmas, além de servir como meio de identificação após a morte celular (devido à liberação dos lipopolissacarídeos ou endotoxinas), pode causar choque séptico (queda de pressão sanguínea e outros sintomas) em seu hospedeiro com maior frequência que as bactérias Gram-positivas (BLACK; BLACK, 2020; TORTORA; FUNKE; CASE, 2020)

Outro motivo para resistência é a presença de plasmídeos de resistência nas bactérias (Fator R ou plasmídeo R) (BLACK; BLACK, 2020). Descoberto no Japão na década de 1950 após uma epidemia de desintéria (TORTORA; FUNKE; CASE, 2020), é composto por duas partes, sendo um fator de transferência de resistência (RFT) e o(s) gene(s) de resistência, tendo como

função o primeiro implementar a transferência do Fator R inteiro por meio de conjugação, enquanto o segundo carregar as informações sobre resistência a um ou mais antibióticos, metais pesados ou toxinas celulares (BLACK; BLACK, 2020; TORTORA; FUNKE; CASE, 2020). Os plasmídeos R podem carrear genes para resistência até 10 antibióticos e, a transferência deste para outra bactéria a confere resistência aos mesmos (BLACK; BLACK, 2020). Diferentes Fatores R, quando presentes na mesma célula, podem recombinar para formar novos fatores R com novas combinações genéticas no seu R-determinante (TORTORA; FUNKE; CASE, 2020).

A transferência não necessariamente ocorre apenas entre espécies, mas pode ocorrer entre gêneros relacionados, como no caso de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* e *Shigella* (BLACK; BLACK, 2020; TORTORA; FUNKE; CASE, 2020). BLACK; BLACK (2020) inferem que conforme pesquisadores obtêm informações sobre os plasmídeos e seu modo de resistência aos antimicrobianos, a preocupação com o surgimento de cepas mais resistentes aumenta, devido à necessidade de utilização de outros antibióticos para o tratamento de doenças causadas por estas cepas, até o momento que os antibióticos existentes não conseguirão mais tratá-las. Por este motivo, é de grande importância a preferência de uso de antibióticos de espectro estreito e não de amplo espectro.

As autoras BLACK; BLACK (2020) também explicam que espectro de ação é a gama de diferentes micro-organismos que um antibiótico atua contra. Amplo espectro é o caso de antimicrobianos que atuam contra diferentes grupos taxonômicos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, enquanto espectro estreito é quando o antibiótico atua apenas em um pequeno número de bactérias. Antibióticos de amplo espectro são especialmente úteis quando o paciente se encontra em um quadro de infecção por bactéria desconhecida, por abranger uma grande quantidade de micro-organismos, é provável que o mesmo seja sensível ao antibiótico. No caso do organismo ser conhecido, é indicado o uso de antibiótico de espectro estreito, que reduz ao máximo a destruição da microbiota nativa do hospedeiro, que em alguns casos pode estar atuando contra o invasor.

As bactérias de escolha, além dos motivos supracitados, também produzem biofilmes. Biofilmes são aglomerados multicelulares de micro-organismos que possuem resistência intrínseca aos antibióticos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro, com facilidade de se ligar à superfícies (OTTO, 2009). A bactéria apresenta uma adaptação ao modo de crescimento do biofilme, incluindo, por exemplo, a desregulação de processos celulares do hospedeiro, como a biossíntese de proteínas e paredes celulares (OTTO, 2009).

A formação do biofilme se dá por processos físicos, biológicos e químicos e é dividido em três etapas. A primeira é a deposição e adesão inicial de micro-organismos flutuantes em uma superfície e a agregação de estruturas multicelulares à esta base devido a liberação de moléculas de indutor (BLACK; BLACK, 2020; OLIVEIRA, W. F. *et al.*, 2018; OTTO, 2009). A ligação célula-célula envolvida neste processo é conhecida como coesão. A segunda etapa é a formação de micro colônias devido a concentração aumentada de células e de moléculas indutoras. Isso causa a entrada de bactérias e a ativação de genes específicos para uma resposta adaptativa como a produção de toxina (BLACK; BLACK, 2020; OLIVEIRA, W. F. *et al.*, 2018). E a terceira fase é a maturação do biofilme envolto em uma matriz contendo proteínas, DNA e açúcares e seu desprendimento do aglomerado (BLACK; BLACK, 2020; OLIVEIRA, W. F. *et al.*, 2018).

Para que os dois primeiros processos ocorram, é necessária uma força chamada adesiva, enquanto que para que o processo de maturação e desprendimento ocorra, é necessária a força disruptiva, responsável pela formação de canais onde passam os nutrientes que sustentam as células, auxiliando na formação da estrutura tridimensional e desprendimento de aglomerados celulares do biofilme. Tal separação limita a expansão do biofilme, mas pode levar à disseminação da infecção (OLIVEIRA, W. F. *et al.*, 2018; OTTO, 2009)

O biofilme geralmente ocorre pela adesão dos componentes de superfície micro-organismos em corpos estranhos colocados em pacientes, como cateteres venosos ou implantes ortopédicos e mamários, causando, conseqüentemente, uma infecção (OLIVEIRA, W. F. *et al.*, 2018). Essas são uma das principais causas para remoção de implantes de pacientes e usualmente necessitam tratamentos difíceis e caros, como antibioticoterapia com diferentes

antimicrobianos, que agem com diferentes mecanismos, todos em altas doses. Tratamento este que pode auxiliar na resistência aos mesmos (OLIVEIRA, W. F. *et al.*, 2018)

Por fim, TORTORA; FUNKE; CASE (2020) resumem uma parte da história microbiológica escrevendo que as bactérias têm se apresentado como um problema contabilizado desde os anos 40, quando a maioria das infecções relacionadas ao cuidado com a saúde eram causadas pelas classificadas como Gram-positivas, sendo, em sua maioria, a *S. aureus*. A partir dos anos 70, o foco mudou para micro-organismos Gram-negativos, como a *E. coli* e a *P. aeruginosa* e então, na década de 80, a preocupação se tornou bactérias Gram-positivas que apresentavam resistência à antibióticos, principalmente *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulase-negativas e *Enterococcus*. Após 20 anos, a preocupação com bactérias que apresentavam resistência à antibióticos aumentou perceptivelmente.

### **3.3.1. *Escherichia coli***

A *Escherichia coli*, mais conhecida como *E. coli*, é um bastonete Gram-negativo anaeróbio facultativo que se prolifera no trato intestinal, em especial no colón, de onde vem o nome da espécie (BLACK; BLACK, 2020; TORTORA; FUNKE; CASE, 2020). Pela sua grande presença no intestino, além de patógeno oportunista pode ser chamada de organismo indicador, pois quando identificada em água ou alimentos indica a contaminação com material fecal (BLACK; BLACK, 2020; TORTORA; FUNKE; CASE, 2020). O micro-organismo é de fácil cultivo e familiar aos pesquisadores (TORTORA; FUNKE; CASE, 2020)

Os autores TORTORA; FUNKE; CASE (2020) explicam que a cistite causada pela *E. coli* é uma inflamação comum na bexiga, causando principalmente dores e poliúria. Embora seja mais comum em mulheres devido à proximidade das aberturas anal e uretral, também ocorre em homens, porém em menor proporção (cerca de oito vezes menos). A bactéria se liga ao trato urinário utilizando suas fímbrias.

BLACK; BLACK (2020) adicionam às informações de TORTORA; FUNKE; CASE (2020) que além do trato urinário e genital, outros locais que podem ser afetados

pela *E. coli* são feridas cutâneas, pulmões, medula espinhal, o próprio intestino, rins e vesícula biliar podendo causar, respectivamente, doenças como abscessos, infecções pulmonares, meningite, gastroenterite bacteriana e/ou desintéria e Síndrome Urêmica Hemolítica e/ou pielonefrite.

Foram identificadas cinco cepas patogênicas da *E. coli*, sendo elas: EPEC (*E. coli* enteropatogênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), EAEC (*E. coli* enteroagressiva), EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) e a cepa STEC (Shiga Toxin *E. coli*), responsável pela produção da toxina Shiga, uma toxina semelhante à Shiga, que é produzida apenas pela bactéria *Shigella dysenteriae* (BLACK; BLACK, 2020; TORTORA; FUNKE; CASE, 2020).

A toxina produzida é liberada após a lise celular, então a antibioticoterapia pode piorar a infecção devido maior quantidade de toxina liberada no organismo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2020). Os autores indicam que a infecção pode ser espalhada pela água ingerida ou alimentos contaminados como a carne bovina. Já que o gado não é afetado por este tipo de patógeno, ele se torna, então, um dos maiores reservatórios. Cerca de 10 a 30% do gado doméstico contém a STEC (TORTORA; FUNKE; CASE, 2020).

### **3.3.2. *Pseudomonas aeruginosa***

O gênero *Pseudomonas* consiste em bacilos Gram-negativos e aeróbios, que se movimentam por meio de um único ou um tufo de flagelos, a depender da espécie (TORTORA; FUNKE; CASE, 2020). Estão muito presentes no solo e na água e apresentam facilidade de crescimento em matérias orgânicas incomuns, como adesivos filmes. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2020)

Assim como outros patógenos oportunistas, a *P. aeruginosa* pode infectar hospedeiros enfraquecidos e causar problemas no trato urinário, em queimaduras, infecções sanguíneas, abscessos e meningite (TORTORA; FUNKE; CASE, 2020).

Algumas espécies podem produzir e excretar pigmentos extracelulares hidrossolúveis. No caso da *P. aeruginosa*, o pigmento é azul esverdeado, chamado piocianina (TORTORA; FUNKE; CASE, 2020). Os autores,

complementando as informações das autoras BLACK; BLACK (2020) explicam que pacientes que apresentam quadro de queimadura grave, em especial de 2º e 3º graus, possuem condições ideais para infecções. Pode-se observar nas infecções por *P. aeruginosa* dos acometidos a presença de pus azul-esverdeado. A coloração se dá pela presença deste pigmento produzido.

A facilidade de crescimento da *P. aeruginosa* é um fator de preocupação principalmente em hospitais, já que ela pode se proliferar em vasos de flores, esfregões, desinfetantes diluídos e em altos níveis de cloro, o que dificulta sua erradicação, por exemplo, de piscinas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2020).

É clarificado por TORTORA; FUNKE; CASE (2020) que a bactéria pode ser a responsável por dermatite por *Pseudomonas*, que é um rash cutâneo que dura cerca de duas semanas e está associado geralmente a ambientes como piscinas, saunas e banheiras. No caso de muitas pessoas utilizarem tais ambientes, o cloro se torna menos efetivo devido a alcalinidade da água e, enquanto isso, a concentração de nutrientes próprios para o crescimento da *P. aeruginosa* aumenta. A água quente causa abertura dos folículos capilares, o que facilita a entrada dos micro-organismos e a infecção pelo mesmo.

Ademais, a *P. aeruginosa* também produz biofilmes cuja substância polimérica extracelular mata fagócitos. Os fagócitos não conseguem passar pelas mesmas, gerando uma armadura nos patógenos que se encontram dentro da mesma (TORTORA; FUNKE; CASE, 2020). No caso de pacientes portadores de fibrose cística que apresentam pneumonia por *P. aeruginosa*, a doença é um exemplo de biofilme formado por este micro-organismo (BLACK; BLACK, 2020)

### **3.3.3. *Staphylococcus epidermidis***

A *Staphylococcus epidermidis* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, que se encaixa na família das coagulase-negativas (CoNs) (indicado pela falta de enzima coagulase, diferentemente da *S. aureus*) (BLACK; BLACK, 2020; BROWN; HORSWILL, 2020; BÜTTNER; MACK; ROHDE, 2015; OLIVEIRA, W. F. *et al.*, 2018; OTTO, 2009; TORTORA; FUNKE; CASE, 2020). Pertencem à flora cutânea comensal de todos os humanos e, em seu nicho natural, apresenta grande importância na manutenção da homeostase local e

integridade da pele, controlando a flora de outros residentes cutâneos e prevenindo a colonização de patógenos tidos como oportunistas, tendo sido categorizado como probióticos devido a este feito (BROWN; HORSWILL, 2020; BÜTTNER; MACK; ROHDE, 2015; OTTO, 2009).

É um micro-organismo que se apresenta em grande quantidade na pele e em mucosas, podendo ser isolada de diferentes regiões em diferentes condições, como áreas secas, úmidas e que apresentam sebo (BROWN; HORSWILL, 2020; BÜTTNER; MACK; ROHDE, 2015; OTTO, 2009). É facilmente isolado, principalmente da axila, cabeça e narinas (OTTO, 2009; TORTORA; FUNKE; CASE, 2020). Pelo fato de seu habitat natural poder apresentar condições severas, as bactérias apresentam genes de adaptação, por exemplo maior quantidade de bombas de sódio/potássio devido à pressão osmótica a que podem se expor (OTTO, 2009).

Devido sua presença abundante na pele e mucosas, não é surpreendente que seja a causa mais comum de contaminações clínicas e de dispositivos hospitalares, passando a ser considerado, então, um patógeno oportunista. (BÜTTNER; MACK; ROHDE, 2015; OTTO, 2009).

Embora raramente se desenvolvam para fatais, as infecções possuem alta frequência e difícil tratamento (OTTO, 2009). OTTO (2009) e OLIVEIRA et al. (2018) informam que o que dificulta o tratamento principalmente é a presença de genes que tornam a *S. epidermidis* resistente a uma gama de mecanismos de defesa do hospedeiro e antibióticos (como metilina, rifampicina, gentamicina, fluorquinolonas, tetraciclina e sulfonamidas). Por ser uma bactéria comensal a humanos e mamíferos, há uma reserva de genes de resistência aos antibióticos, além de haver a transmissão horizontal de genes que geram resistência à antibióticos.

Além da resistência, a habilidade de formação de biofilmes por parte do micro-organismo é um fator agravante (OTTO, 2009).

### 3.3.4. *Staphylococcus aureus*

Assim como a *S. epidermidis*, a *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva anaeróbia facultativa em formato de cocos, geralmente agrupadas em formato de cachos (APOLINÁRIO, 2021; BLACK; BLACK, 2020). Embora apresente cepas que façam parte da família dos estafilococos coagulase negativa (CoNs) (RIOS *et al.*, 2020), em sua maioria há a presença da enzima coagulase, fazendo estas cepas, então, parte da família dos estafilococos coagulase-positivos, considerada entre as duas a mais agressiva (OTTO, 2009; RIOS *et al.*, 2020).

Mesmo que em menor quantidade, *S. aureus* coagulase negativa tem aparecido na clínica mais frequentemente, sendo considerada, assim como a *S. epidermidis*, um agente oportunista causador de sérias infecções, em especial em pacientes hospitalizados, devido sua grande presença na microbiota da pele e mucosas (RIOS *et al.*, 2020).

Além disso, as bactérias deste gênero são as causas mais comuns de conjuntivite do tipo bacteriana, sendo a *S. epidermidis* responsável pela maior parte (43 a 48%), enquanto a *S. aureus* representa uma porcentagem menor (entre 23 a 35%) (GARCIA; BAQUERO; RODRÍGUEZ, 2020). Furúnculos, síndrome da pele escaldada, otites média e externa e septicemia são outras doenças que a bactéria pode causar (BLACK; BLACK, 2020).

Em adição a ser responsável por certa porcentagem de conjuntivite, a *S. aureus* produz endotoxinas responsáveis pela intoxicação alimentar e também pode formar biofilme em dispositivos prostéticos e implantes (APOLINÁRIO, 2021; MOORMEIER; BAYLES, 2017; SURESH; BISWAS; BISWAS, 2019), assim como a *S. epidermidis*.

Quanto à resistência aos antibióticos, as cepas do *S. aureus* apresentam ampla resistência, por exemplo, à meticilina, como a cepa conhecida como MRSA (Meticilin-resistant *Staphylococcus aureus*) ou à vancomicina, VRSA (Vancomycin-resistant *S. aureus*) (VRSA) (GARCIA; BAQUERO; RODRÍGUEZ, 2020; OLIVEIRA, W. F. *et al.*, 2018; TORTORA; FUNKE; CASE, 2020).

GARCIA; BAQUERO; RODRÍGUEZ (2020), considerando os efeitos adversos que são gerados no paciente devido o tratamento com antibióticos, podendo afetar ambos sistemas nervosos central e periférico, buscou alternativas naturais

para o tratamento, utilizando plantas medicinais que, em combinação com antibióticos, diminuiriam os efeitos adversos do segundo e potencializariam a atividade das primeiras.

### **3.4. Teste de Sensibilidade em Disco**

O teste de sensibilidade em disco foi idealizado por Bauer e Kirby no ano de 1966 e se baseia na difusão do antibiótico escolhido em uma placa de ágar Mueller-Hinton semeada com bactérias (BAUER *et al.*, 1966; SEJAS *et al.*, 2003). O intuito do teste era determinar a susceptibilidade de bactérias com antibióticos e agentes quimioterápicos (BAUER *et al.*, 1966).

O método de Bauer consistia em coletar entre 3 a 10 colônias de bactérias do disco em que a cultura original se encontra e coloca-las, com o auxílio de uma alça, em um tubo contendo 4mL de triptose fosfato ou caldo tripticase de soja. Após um período entre 2 a 5h de incubação e formação de turbidez, a suspensão é diluída em água destilada ou solução salina a 0,9% até atingir certo teor de turbidez (BAUER *et al.*, 1966). Para os testes, são utilizadas placas de Petri de aproximadamente 15cm de diâmetro com uma camada de ágar Mueller-Hinton com 5 a 6mm de espessura e que, após este estar gelatinizado, a suspensão diluída de bactérias é semeada com o auxílio de um swab. Após a secagem do inóculo, em um período entre 3 a 5 min, os discos contendo antibióticos são gentilmente colocados e levemente pressionados para garantir a fixação do mesmo na camada de ágar. A placa de Petri então é incubada durante a noite e, no dia seguinte, a leitura dos halos é realizada com uma régua ou paquímetro. Os valores obtidos após a medição são comparados com uma tabela, definindo então, desta maneira, se a atividade da bactéria apresentada é considerada sensível (S), indefinida (I) ou resistente (R) (BAUER *et al.*, 1966; SEJAS *et al.*, 2003)

Bauer apresenta uma tabela em seu artigo, que era utilizada na época, porém com o avanço da tecnologia e aumento de estudos na área microbiológica, outras tabelas mais detalhadas são utilizadas, como as tabelas atualizadas do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI)(AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008), que é uma organização não governamental (ONG) que desenvolve mundialmente padrões laboratoriais em diferentes frentes, como hematologia, imunologia e

microbiologia, por meio de pesquisas voluntárias (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2022)

SEJAS et al. (2003) explica que o teste de sensibilidade em disco é um método rápido, prático e econômico, pois as bactérias de escolha geralmente são de crescimento rápido, os reagentes são econômicos e não são necessários equipamentos especiais tanto para a preparação como para a leitura de resultados e é importante que o teste seja realizado com controle adequado e a leitura de resultados seja cuidadosa, já que tais resultados interferem na escolha terapêutica do antibiótico, podendo causar falhas terapêuticas, riscos para o paciente e a resistência de bactérias a diferentes antibióticos, podendo criar superbactérias.

São chamadas superbactérias os micro-organismos bacterianos que apresentam resistência a diferentes classes de antibióticos devido ao uso indiscriminado e inadequado dos mesmos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007; COSTA, 2019). A resistência pode ser adquirida por meio de mutações genéticas ou por transferências genéticas, por exemplo, durante a transferência de plasmídeos entre bactérias durante o processo de conjugação (COSTA, 2019; NASCIMENTO, 2016). A definição de resistência bacteriana pode ser definida por um critério microbiológico (que diz que a cepa resistente é aquela que consegue se desenvolver estando na presença de um antibiótico com concentração acima da suportada por bactérias tidas como sensíveis) ou pelo critério clínico (em que a cepa não é combatida por um antimicrobiano usualmente utilizado com eficácia clínica garantida (COSTA, 2019; NASCIMENTO, 2016).

### **3.5. Nanoformulação**

Nanoformulações são compostas por partículas que apresentam tamanho entre 1 a 100 nm ( $10^{-9}$ ). São também definidas como misturas de duas fases óleo e água estabilizada por um sistema tensoativo em nano-fase aquosa (OLIVEIRA, A. P., 2016). Por causa do reduzido tamanho da partícula, a probabilidade de sedimentação é diminuída e a estabilidade da fase oleosa é aumentada. O

tamanho e diâmetro reduzidos geram um aumento de superfície de contato. (GONZÁLEZ *et al.*, 2014; MONTEFUSCOLI *et al.*, 2014; OLIVEIRA, A. P., 2016)

Quando produzidos com compostos botânicos, há benefícios na utilização de nanoformulações, como estabilidade frente à temperatura e luz, maior eficácia e indução de atividade sistêmica devido ao reduzido tamanho das partículas e, conseqüentemente, maior área de superfície e a indução de atividade sistêmica, além de liberação controlada dos compostos e proteção contra perdas por evaporação (CERQUEIRA, 2018; GONZÁLEZ *et al.*, 2014; OLIVEIRA, A. P., 2016).

## **4. Materiais**

### **4.1. Planta Escolhida**

- Folhas secas de *Nectandra nitidula*;
- Folhas frescas de *N. nitidula*.

### **4.2. Vidrarias e Plásticos**

- Frasco para acondicionar o OE;
- Pipeta de Pasteur de vidro acoplada à pera de borracha;
- Placas de Petri de tamanhos pequeno, médio e grande;
- Cubetas de quartzo;
- Eppendorfs de volumes variados;
- Discos de papel filtro autoclavados de 8mm de diâmetro;

### **4.3. Equipamentos**

- Banho ultratermostatizado
- Bomba aquecedora de água
- Destilador Linax (Figura 2)
- Centrífuga
- Balanças analíticas calibradas
- Geladeira
- Espectrofotômetro
- Mixer
- Zetasizer
- Capela de Fluxo
- Autoclave
- Estufa
- Chapa aquecedora



Figura 2 - Aparelho destilador composto por bomba de refrigeração de água, bomba de aquecimento de água e destilador (corpo, condensador e seringa coletora, que se encontra coberta por papel alumínio) (Acervo Pessoal)

#### 4.4. Reagentes

- Ágar Nutriente;
- Ágar Mueller Hinton;
- Água destilada;
- Solução salina 0,9%;
- Água Milli-Q;
- Croduret;
- Span 60;

## 5. Metodologia

### 5.1. Manuseio da planta *Nectandra nitidula*

As amostras de folhas das plantas foram obtidas na cidade de Ouro Preto, Minas Gerais coletadas e transportadas para o laboratório de Fitotecnologia da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto. As folhas então foram submetidas a separação entre secas e frescas. Enquanto as primeiras foram descartadas, as segundas foram utilizadas na pesquisa, sendo partidas grosseiramente em pedaços médios e grandes.

O aparelho destilador (Figura 2) foi preparado da seguinte forma: o banho ultratermostatizado foi ligado para resfriar a água e enviá-la para o condensador. Enquanto isso, a bomba aquecedora de água também foi ligada e ajustada sua potência entre 20 e 40%. A tampa do aparelho foi aberta e o tambor interno retirado e pesado, tendo sua massa inicial anotada. O fundo do mesmo foi forrado com papel filtro. As plantas previamente cortadas foram colocadas no tambor e esse pesado novamente, com a massa final anotada. O tambor foi inserido no aparelho destilador e esse cuidadosamente e devidamente fechado.

Ao se perceber que o processo de condensação se iniciou, a seringa lateral coletora (Figura 3) foi coberta por papel alumínio, para evitar que o óleo essencial coletado pudesse ser degradado pela luz ou volatilizado.



Figura 3 - Detalhe do destilador com seringa lateral durante processo de destilação, com seringa lateral coberta com papel alumínio.

Após 3 horas e 30 minutos, a proteção de papel alumínio da seringa foi retirada e o óleo essencial coletado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro em

um frasco devidamente pesado com sua massa inicial anotada. O frasco com o óleo (Figura 4) então foi embalado em papel alumínio e devidamente identificado com etiqueta e guardado em geladeira, para evitar sua degradação por fotólise ou por reações internas próprias que pudessem degradar os compostos presentes no óleo, causando a perda de propriedades do mesmo.



Figura 4 - Frasco receptor de OE de *N. nitidula* com invólucro de papel alumínio aberto para mostrar a quantidade de OE e água presente no frasco (Dia 07/10/2021)

## 5.2. Pesquisa com micro-organismos

Os micro-organismos utilizados na avaliação de atividade antimicrobiana foram definidos em relação a aplicabilidade na área de saúde.

A pesquisa microbiológica consistiu em avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial e definição da concentração inibitória mínima.

As bactérias utilizadas na pesquisa foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto. Para sua utilização, foram preparadas quatro placas de Petri pequenas com ágar nutriente previamente esterilizado e após seu endurecimento nas placas, cada uma foi semeada com auxílio de alça bacteriológica de metal esterilizada em chama com um micro-organismo, sendo eles *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Após incubação em estufa à 37°C para crescimento, foram armazenadas em geladeira em temperatura entre 2°C a 5°C. Este primeiro processo deu origem às placas estoque iniciais. Um repique inicial foi realizado das primeiras placas estoque para quatro placas de Petri médias contendo ágar

Mueller-Hinton autoclavado, sendo estas as segundas placas estoque, que seriam utilizadas para preparo de suspensão bacteriana, evitando que, por descuido, as colônias iniciais pudessem se perder devido contaminação.

A metodologia do teste de difusão em disco foi seguida de acordo com as instruções de CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2012) e OSTROSKY *et al.* (2008). Com uma alça bacteriológica esterilizada, colônias de bactérias foram coletadas das placas estoque secundárias e suspensas em 5mL de solução salina esterilizada, com concentração 0,9%, para que fosse possível obter solução turva correspondente a 0,5 da escala McFarland. A visualização da turbidez foi realizada à olho nu, comparando a suspensão com um tubo contendo a solução com turbidez correta. Após a homogeneização da suspensão, um swab estéril foi introduzido no tubo e comprimido contra a parede do mesmo para retirada de excesso da suspensão do swab. A semeadura foi realizada em placas contendo ágar Mueller-Hinton de maneira estriada, em três direções, girando a placa em 60° após cada semeadura, realizadas em formato de estrias. Após este processo, as placas foram mantidas cerca de três minutos em cima da bancada e na área estéril para que pudesse secar adequadamente. Os discos de papel filtro foram obtidos após utilizar um furador em uma folha de papel filtro, dando origem a discos de 8mm de diâmetro. Após sua obtenção, os discos foram autoclavados por 30 min à temperatura de 120°C.

Os discos, então, foram colocados com o auxílio de uma pinça de metal esterilizada a fim de evitar contaminação, sendo inicialmente, cinco discos por placa (um controle positivo, um controle negativo e três discos com OE) e, após testes, três discos (um controle positivo, um controle negativo e um disco contendo OE). Após serem gentilmente pressionados no ágar para garantir adesão, foram colocados, em quantidades variando entre 7µL e 10µL, o antibiótico de escolha como controle positivo (sendo, para *E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis* a tetraciclina e para *P. aeruginosa*, norfloxacina), DMSO como controle negativo e o óleo essencial de *N. nitidula* nos discos restantes. Após este procedimento, as placas foram armazenadas em estufa à 37°C para incubação durante a noite. Após 24h, as placas foram examinadas para verificar se o crescimento bacteriano havia sido uniforme, presença de possíveis contaminantes, se havia presença de halo ao redor dos discos contendo o óleo

essencial testado e se o mesmo possuía diâmetro bem definido. Após inspeção visual, as placas foram colocadas com o fundo para cima e em fundo preto para facilitar a leitura dos halos, realizada com uma régua. Os valores obtidos foram interpretados de acordo com os critérios de interpretação preconizados pelo CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2020).

Para os micro-organismos *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* foi utilizado o antibiótico tetraciclina em concentração 50 µg/mL, preparado da seguinte maneira: 0,005g de tetraciclina em pó foi pesada em Eppendorf autoclavado e então solubilizada em 1000µL (1mL) de água destilada. Após isto, 100µL da solução homogeneizada foi retirada e passada para outro Eppendorf e o volume completo com 900µL de água, para garantir que a concentração do antibiótico fosse de 50µg/mL. Para o micro-organismo *P. aeruginosa* o antibiótico utilizado foi a norfloxacinina em concentração 20µg/mL, com processo de preparação semelhante ao anterior, porém devido a dificuldade de solubilizá-la em água, 0,002g da norfloxacinina foi solubilizada em 1000 µL de DMSO e homogeneizado corretamente. Foram transferidos 100 µL da solução para outro Eppendorf e diluídos em 900µL de água destilada, chegando à concentração final de 20µg/mL.

Após leitura dos halos adequadamente e obtenção de valores, as placas utilizadas para o teste de sensibilidade em disco foram levadas para desinfecção em autoclave por 30min a 120°C e lavadas após resfriamento para que pudessem ser reutilizadas.

### **5.3. Preparo de nanoformulação**

Para o preparo da nanoformulação que seria utilizada no teste de concentração inibitória mínima, foram testadas 4 proporções entre os tensoativos Croduret e Span 60. As formulações possuíam volume final 5mL e tinham como composição 5% do volume final de tensoativos (0,25mL) (Proporções apresentadas no Quadro 1), 5% do volume final de OE (0,25mL) e 90% composto por água destilada (4mL).

Formulação	Croduret (g)	Proporção	Span 60 (g)
1	0,05	4:1	0,20
2	0,10	3:2	0,15
3	0,15	2:3	0,10
4	0,20	1:4	0,05

Quadro 1 - Quadro apresentando valores de proporções relacionados às formulações preparadas

Os tensoativos foram pesados em béqueres e aquecidos em chapa até 70°C. Em outro béquer, água destilada também foi aquecida à mesma temperatura. Quando ambos atingiram a temperatura estipulada, a fase lipofílica era retirada da fonte de calor, sendo então adicionado o óleo essencial e colocados sob agitação em mixer em 600rpm, enquanto a água era adicionada lentamente. A formulação foi vigorosamente agitada até resfriamento em temperatura ambiente. É possível observar as formulações na Figura 32.

As formulações 3 e 4 foram levadas ao aparelho Zetasizer para leitura de tamanho de partícula e índice de polidispersão.

Ambas necessitaram ser diluídas duas vezes. Uma obrigatória para a leitura em aparelho (sendo a proporção 998µL água Milli-Q: 2µL formulação) e uma segunda para garantir que a solução não se apresentasse tão concentrada quanto na primeira diluição (3000µL água Milli-Q: 2µL formulação).

Após as leituras, duas novas formulações foram realizadas com o mesmo procedimento, porém com valores diferentes. Ambas novas formulações variaram suas proporções em torno do valor da formulação 4 (nanoformulação) e novamente lidas no aparelho Zetasizer, seguindo os mesmos procedimentos e proporções de diluição (998µL:2µL):

Formulação	Croduret (g)	Proporção	Span 60 (g)

4.1	0,225	4,5:0,5	0,025
4.2	0,175	3,5:1,5	0,075

Quadro 2 - Quadro apresentando valores de proporções relacionados às formulações preparadas

## 6. Resultados

### 6.1. Óleo Essencial

Data	Massa tambor vazio (g)	Massa tambor com folhas (g)	Massa folhas (g)	Tempo de extração
21/06/2021	1950,00	2233,70	283,70	3h30min
22/06/2021	1972,40	2275,03	302,92	3h
24/06/2021	1974,90	2244,26	269,36	3h30min
25/06/2021	1973,94	2193,97	220,03	3h
TOTAL	-	-	1076,01	-

Quadro 3 - Dados da primeira extração (extração realizada com folhas secas)

A primeira extração de OE foi realizada com folhas secas, entre os dias 21/06/2021 a 25/06/2021. O tempo de extração variou entre 3h e 3h30min e a massa de folhas utilizada foi de 1076,01g. Por se tratar de folhas secas, não foi possível mensurar a quantidade obtida de OE total devido a baixíssima quantidade obtida.



Figura 5 – Volume obtido de OE de acordo com o Quadro 3 (data da imagem: 30/06/2021)

Data	Massa Tambor Vazio (g)	Massa Tambor com folhas (g)	Massa folhas (g)	Tempo	Observação sobre folhas
06/10/2021	1966,97	2528,48	561,50	3h30min	Cortadas dia 06
07/10/2021	1975,29	2557,27	581,98	3h30min	Cortadas dia 06
08/10/2021	1978,02	2517,19	539,17	3h30min	Cortadas dia 06/07/08
13/10/2021	1979,72	2536,64	556,92	3h30min	Cortadas dia 8
14/10/2021	1975,85	2532,68	556,83	3h30min	Cortadas dia 13
15/10/2021	1979,11	2511,38	532,27	3h30min	Cortadas dia 14/15
19/10/2021	1972,81	2183,81	211,00	3h	Cortadas dia 19
TOTAL	-	-	3539,67	-	-

Quadro 4 - Dados da segunda extração (extração realizada com folhas frescas)

Data	Massa do Frasco com OE (g)	Massa de OE no frasco + água (g)	Diferença de massa entre o dia atual e o dia anterior (g)
06/10/2021 – Antes da extração	22,819	0,000	0,000
06/10/2021 – Após a extração	24,088	1,269	1,269
07/10/2021	27,059	4,240	2,971
08/10/2021	29,191	6,372	2,132
13/10/2021	30,170	7,351	0,979
14/10/2021	32,326	9,507	2,156
15/10/2021	34,030	11,211	1,704
19/10/2021	34,030	11,211	0,000
TOTAL	34,030	11,211	-

Quadro 5 - Acompanhamento da massa do primeiro frasco acondicionador do OE extraído de folhas frescas de *N. nitidula* com quantidade mínima de água



Figura 6 - Frasco iniciado dia 06/10/2021 completo com OE de *N. nitidula* (15/10/2021)



Figura 7 - Frasco iniciado dia 19, porém não pesado por apresentar características diferentes na seringa coletora, pipeta de Pasteur e no frasco acondicionador (vide líquido com aparência emulsionada abaixo do óleo essencial)

## 6.2. Micro-Organismos

Para a leitura das placas do teste de sensibilidade e melhor entendimento dos quadros apresentados, foram utilizados os seguintes códigos:

+: Disco contendo controle positivo (antibiótico)

-: Disco contendo controle negativo (DMSO)

1, 2, 3: Discos contendo OE de *N. nitidula*

ND: Não Detectado

### 6.2.1. Leitura dia 30/11/2021

As leituras foram realizadas em triplicata (3 discos de óleo essencial) na mesma placa. Para isso, foram utilizadas placas grandes. Para todas as leituras realizadas neste dia, a quantidade utilizada de controle positivo (antibiótico), controle negativo (DMSO) e óleo essencial foi de 10 $\mu$ L/disco.

MO: *Pseudomona aeruginosa* – Antibiótico utilizado: Tetraciclina (50µg/mL).

Disco	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
+	Sim	ND
-	Não	0,0
1	Sim	ND
2	Sim	9,0
3	Sim	8,0

Quadro 6 - Apresentação de presença de atividade, valor do diâmetro do halo em mm e a distância entre a borda do disco e borda do halo em mm para o micro-organismo *Pseudomona aeruginosa*. Sendo o disco do meio o controle positivo (+), o disco acima deste o controle negativo (-) e, em sentido anti-horário à partir do disco – os discos 1, 2 e 3.

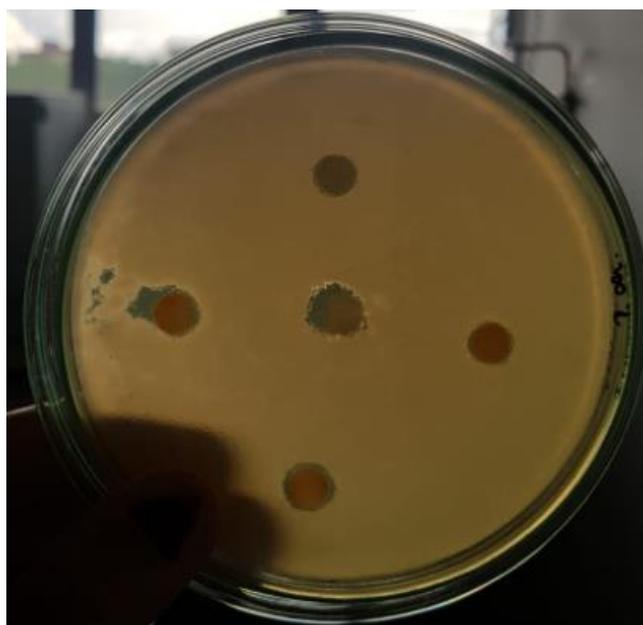


Figura 8 - Placa 1 de *Pseudomona aeruginosa* com 5 discos e seus respectivos halos de atividade, sendo um o controle positivo (central), um o controle negativo (acima do central) e três com o óleo essencial de *Nectandra nitidula* (sendo, em sentido anti-horário a partir do controle negativo, 1, 2 e 3).

Devido ao tamanho dos halos, a medição do controle positivo e do disco 1 foi dificultada.

MO: *Pseudomona aeruginosa* ATCC - Antibiótico utilizado: Tetraciclina (50µg/mL).

Disco	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
+	Sim	15,0
-	Não	ND
1	Sim	9-10,0
2	Sim	9,0
3	Sim	10,0

Quadro 7 - Apresentação de presença de atividade, valor do diâmetro do halo em mm e a distância entre a borda do disco e borda do halo em mm para o micro-organismo *Pseudomona aeruginosa*



Figura 9 – Placa 2 de *Pseudomona aeruginosa* com 5 discos e seus respectivos halos de atividade, sendo um o controle positivo, um o controle negativo e três com o óleo essencial de *Nectandra nitidula*

Os primeiros discos de *P. aeruginosa* foram realizados os estes com antibiótico tetraciclina. O antibiótico apresentou resultados, porém não é o antibiótico padronizado para o teste.

MO: *Staphylococcus aureus* – Antibiótico utilizado: Tetraciclina (50µg/mL)

Disco	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
+	Sim	ND
-	Não	0,0
1	Sim	ND
2	Sim	10,0
3	Sim	14-16,0

Quadro 8 - Apresentação de presença de atividade, valor do diâmetro do halo em mm e a distância entre a borda do disco e borda do halo em mm para o micro-organismo *Staphylococcus aureus*

Neste disco houve mistura de atividades entre o disco de controle positivo e o disco 1.

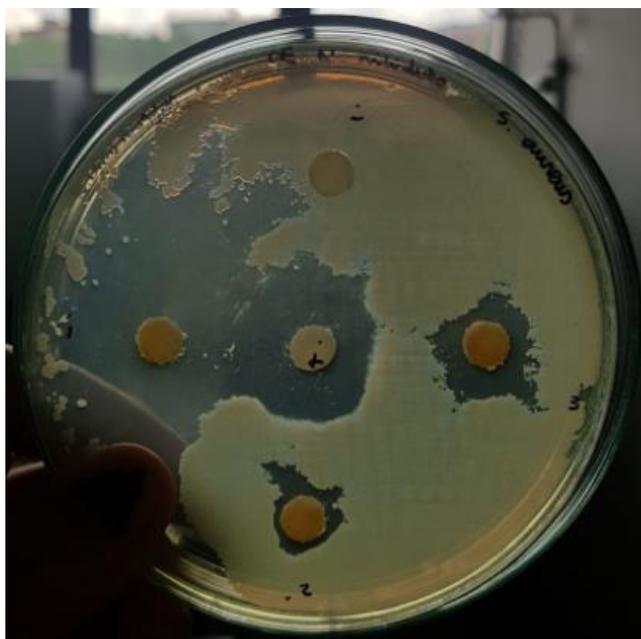


Figura 10 - Placa de *Staphylococcus aureus* com 5 discos e seus respectivos halos de atividade, sendo um o controle positivo (+), um o controle negativo (-) e três com o óleo essencial de *Nectandra nitidula* (1, 2, 3)

MO: *Escherichia coli* - Antibiótico utilizado: Tetraciclina (50µg/mL)

Disco	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
+	Sim	13,0
-	Não	0,0
1	Sim	0,0
2	Sim	0,0
3	Sim	0,0

Quadro 9 - Apresentação de presença de atividade, valor do diâmetro do halo em mm e a distância entre a borda do disco e borda do halo em mm para o micro-organismo *Escherichia coli*



Figura 11 - Placa de *Escherichia coli* com 5 discos e seus respectivos halos de atividade, sendo um o controle positivo, um o controle negativo e três com o óleo essencial de *Nectandra nitidula*

O halo de atividade dos discos estava muito pequeno, o que dificultou a medição.

### 6.2.2. Leitura dia 04/12/2021

As leituras foram novamente realizadas em triplicata (3 discos de óleo essencial) na mesma placa e de tamanho grande.

MO: *Escherichia coli* - Antibiótico utilizado: Tetraciclina (50µg/mL). Volume utilizado nos discos: 10µL

Disco	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
+	Sim	23,0
-	Não	0,0
1	Sim	10,0
2	Sim	10,5
3	Sim	10,0

Quadro 10 - Apresentação de presença de atividade, valor do diâmetro do halo em mm e a distância entre a borda do disco e borda do halo em mm para o micro-organismo *Escherichia coli*

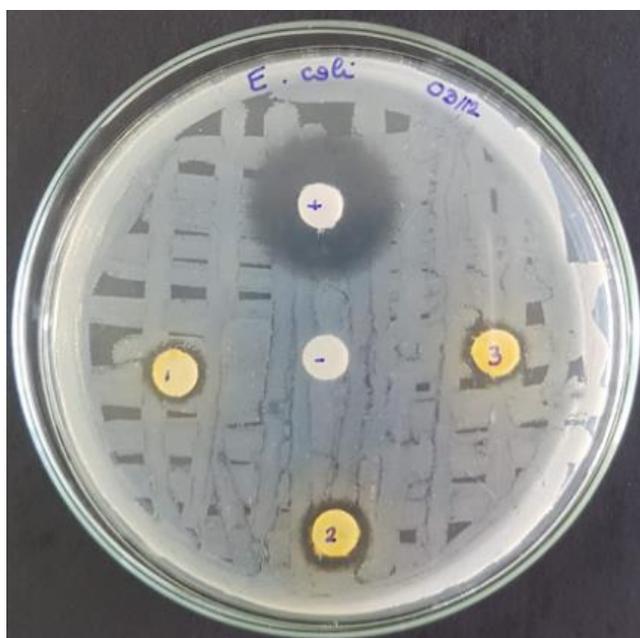


Figura 12 - Placa de *Escherichia coli* com 5 discos e seus respectivos halos de atividade, sendo um o controle positivo (+), um o controle negativo (-) e três com o óleo essencial de *Nectandra nitidula* (1, 2, 3)

MO: *Staphylococcus aureus* – Antibiótico utilizado: Tetraciclina (50µg/mL).

Volume utilizado por disco: 8,5µL

Disco	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
+	Sim	ND
-	Não	ND
1	Sim	ND
2	Sim	ND
3	Sim	ND

Quadro 11 - Apresentação de presença de atividade, valor do diâmetro do halo em mm e a distância entre a borda do disco e borda do halo em mm para o micro-organismo *Staphylococcus aureus*

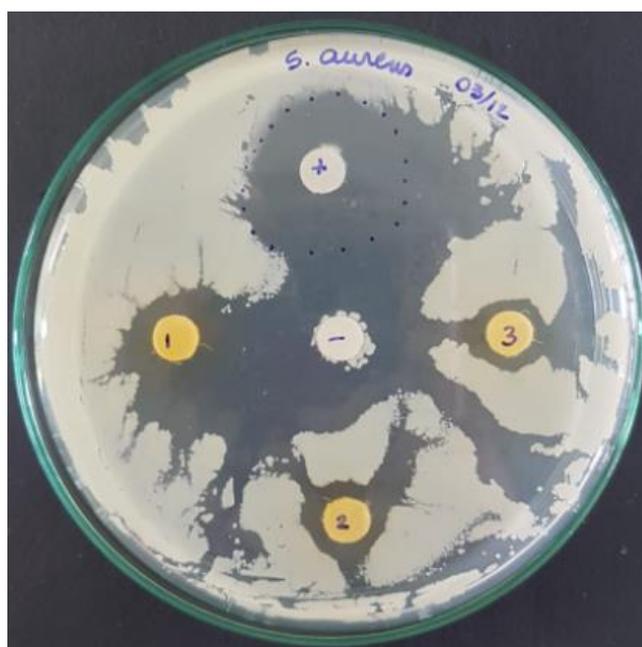


Figura 13 - Placa de *S. aureus* com 5 discos e seus respectivos halos de atividade, sendo um o controle positivo (+), um o controle negativo (-) e três com o óleo essencial de *N. nitidula* (1, 2, 3)

Houve atividade, porém mal definida, semelhante ao primeiro experimento, dificultando a medição. Halos mal definidos e mistura de atividade, não possibilitando a medição dos mesmos.

MO: *Staphylococcus epidermidis* – Antibiótico utilizado: Tetraciclina (50µg/mL).

Volume utilizado por disco: 8,5µL.

Disco	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
+	Sim	33,0
-	Não	0,0
1	Sim	21,0
2	Sim	23,0
3	Sim	25,0

Quadro 12 - Apresentação de presença de atividade, valor do diâmetro do halo em mm e a distância entre a borda do disco e borda do halo em mm para o micro-organismo *Staphylococcus epidermidis*

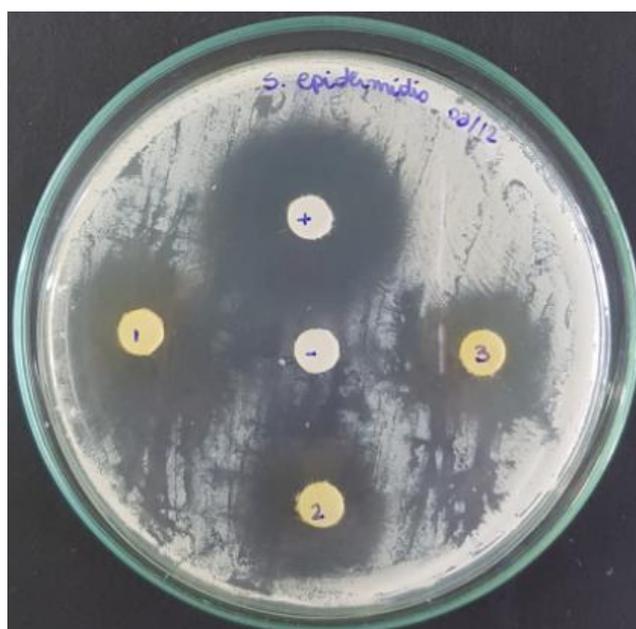


Figura 14 - Placa de *S. epidermidis* com 5 discos e seus respectivos halos de atividade, sendo um o controle positivo (+), um o controle negativo (-) e três com o óleo essencial de *N. nitidula* (1, 2, 3)

MO: *Pseudomona aeruginosa* - Antibiótico utilizado: Tetraciclina (50µg/mL).

Volume utilizado por disco: 8,5µL.

Disco	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
+	Sim	18,0
-	Não	ND
1	Sim	ND
2	Sim	ND
3	Sim	ND

Quadro 13 - Apresentação de presença de atividade, valor do diâmetro do halo em mm e a distância entre a borda do disco e borda do halo em mm para o micro-organismo *Pseudomona aeruginosa*

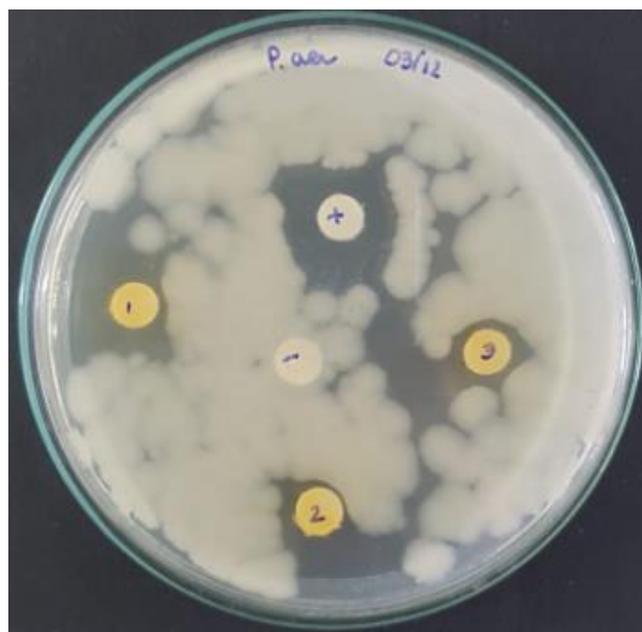


Figura 15 – Placa 1 de *P. aeruginosa* com 5 discos e seus respectivos halos de atividade, sendo um o controle positivo (+), um o controle negativo (-) e três com o óleo essencial de *N. nitidula* (1, 2, 3)

Novamente os halos se encontraram mal definidos, havendo dificuldade para medição dos mesmos.

MO: *Pseudomona aeruginosa* - Antibiótico utilizado: Tetraciclina (50µg/mL).

Volume utilizado por disco: 8,0µL.

Disco	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
+	Sim	19,0
-	Não	0,0
1	Sim	11,0
2	Sim	11,5
3	Sim	ND

Quadro 14 - Apresentação de presença de atividade, valor do diâmetro do halo em mm e a distância entre a borda do disco e borda do halo em cm para o micro-organismo *Pseudomona aeruginosa*



Figura 16 - Placa 2 de *P. aeruginosa* com 5 discos e seus respectivos halos de atividade, sendo um o controle positivo (+), um o controle negativo (-) e três com o óleo essencial de *N. nitidula* (1, 2, 3)

Embora não seja o antibiótico correto de acordo com o procedimento, a tetraciclina apresentou atividade inibitória em ambas as placas.

MO: *Pseudomona aeruginosa* - Antibiótico utilizado: Norfloxacin (20µg/mL).

Volume utilizado por disco: 8,0µL

Disco	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
+	Sim	21,0
-	Não	0,0
1	Sim	10,0
2	Sim	ND
3	Sim	ND

Quadro 15 - Apresentação de presença de atividade, valor do diâmetro do halo em mm e a distância entre a borda do disco e borda do halo em mm para o micro-organismo *Pseudomona aeruginosa*

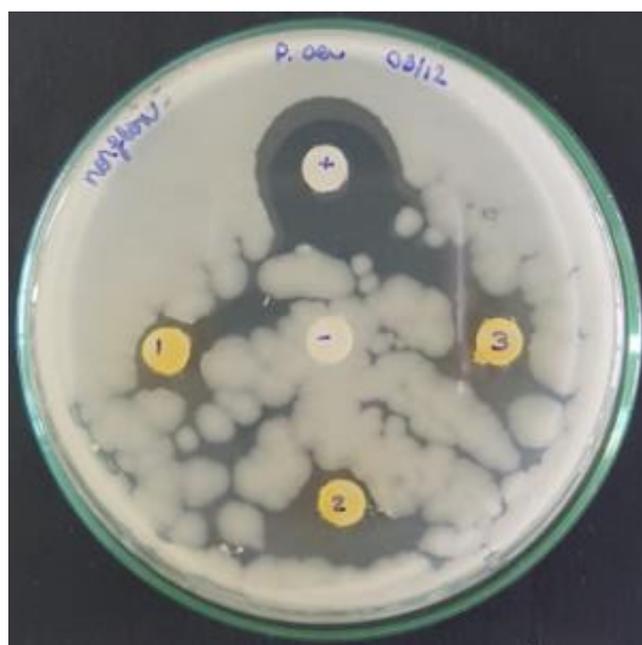


Figura 17 - Placa 3 de *P. aeruginosa* com 5 discos e seus respectivos halos de atividade, sendo um o controle positivo (+), um o controle negativo (-) e três com o óleo essencial de *N. nitidula* (1, 2, 3)

MO: *Pseudomona aeruginosa* - Antibiótico utilizado: Norfloxacina (20µg/mL).

Volume utilizado por disco: 8,0µL

Disco	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
+	Sim	22,0
-	Não	0,0
1	Sim	18,0
2	Sim	12,0
3	Sim	ND

Quadro 16 - Apresentação de presença de atividade, valor do diâmetro do halo em mm e a distância entre a borda do disco e borda do halo em mm para o micro-organismo *Pseudomona aeruginosa*

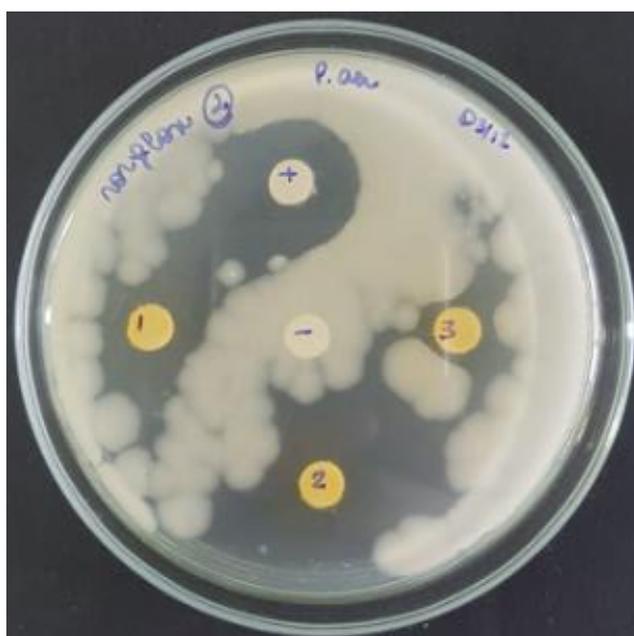


Figura 18 - Placa 4 de *P. aeruginosa* com 5 discos e seus respectivos halos de atividade, sendo um o controle positivo (+), um o controle negativo (-) e três com o óleo essencial de *N. nitidula* (1, 2, 3)

### 6.2.3. Leitura dia 06/12/2021

MO: *Staphylococcus epidermidis* - Antibiótico utilizado: Tetraciclina (50µg/mL).

Volume utilizado por disco: 8,5µL.

Disco	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
+	Sim	27,0
-	Não	0,0
1	Sim	17,0
2	Sim	18,0
3	Sim	16,0

Quadro 17 - Apresentação de presença de atividade, valor do diâmetro do halo em mm e a distância entre a borda do disco e borda do halo em mm para o micro-organismo *Staphylococcus epidermidis*



Figura 19 - Placa de *S. epidermidis* com 5 discos e seus respectivos halos de atividade, sendo um o controle positivo (+), um o controle negativo (-) e três com o óleo essencial de *N. nitidula* (1, 2, 3)

#### 6.2.4. Leitura dia 10/12/2021

Em todos os discos foram utilizados 8,5µL.

MO: *Escherichia coli* - Antibiótico utilizado: Tetraciclina (50µg/mL). Feito em uma placa média.

Disco	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
+	Sim	28,0
-	Não	0,0
1	Sim	11,0

Quadro 18 - Apresentação de presença de atividade, valor do diâmetro do halo em mm e a distância entre a borda do disco e borda do halo em mm para o micro-organismo *Escherichia coli*

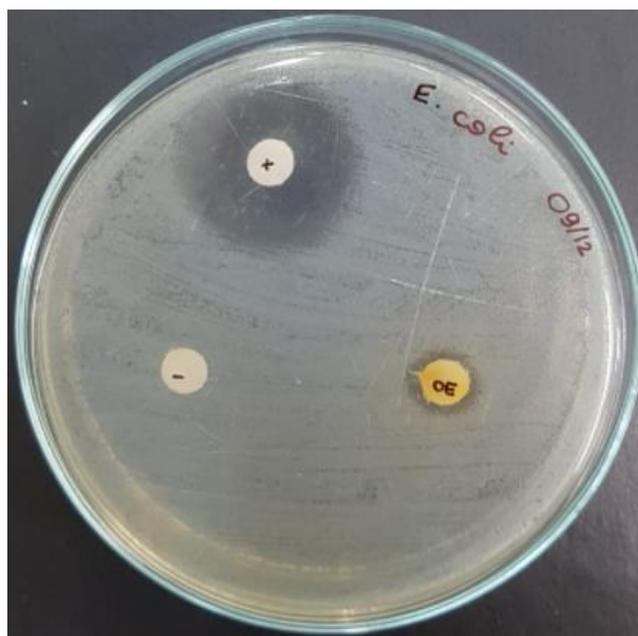


Figura 20 - Placa de *E. coli* com 3 discos e seus respectivos halos de atividade, sendo um o controle positivo (+), um o controle negativo (-) e o terceiro com o óleo essencial de *N. nitidula* (OE)

MO: *Staphylococcus aureus* – Antibiótico utilizado: Tetraciclina (50µg/mL). Feito em uma placa grande.

Disco	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
+	Sim	26,0
-	Não	9,0
1	Sim	12,0

Quadro 19 - Apresentação de presença de atividade, valor do diâmetro do halo em mm e a distância entre a borda do disco e borda do halo em mm para o micro-organismo *Staphylococcus aureus*

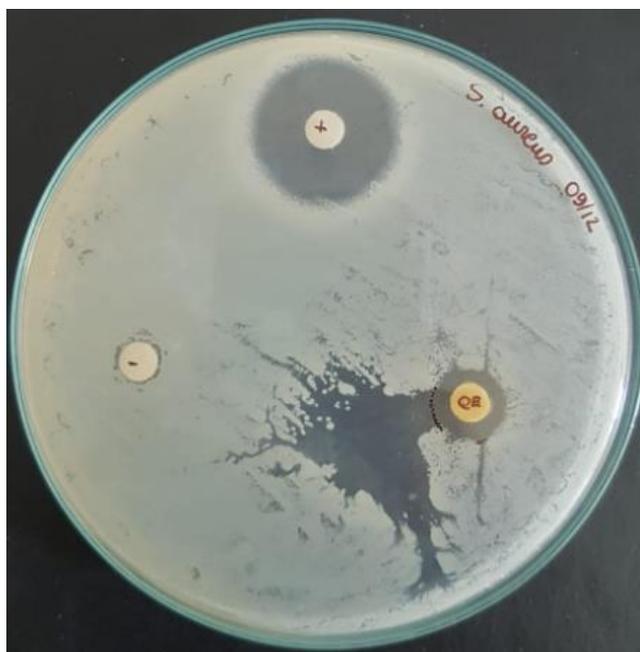


Figura 21 - Placa de *S. aureus* com 3 discos e seus respectivos halos de atividade, sendo um o controle positivo (+), um o controle negativo (-) e o terceiro com o óleo essencial de *N. nitidula* (OE)

MO: *Staphylococcus epidermidis* – Antibiótico utilizado: Tetraciclina (50µg/mL).

Feito em uma placa grande.

Disco	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
+	Sim	30,0
-	Não	9,0
1	Sim	18,0

Quadro 20 - Apresentação de presença de atividade, valor do diâmetro do halo em mm e a distância entre a borda do disco e borda do halo em mm para o micro-organismo *Staphylococcus epidermidis*

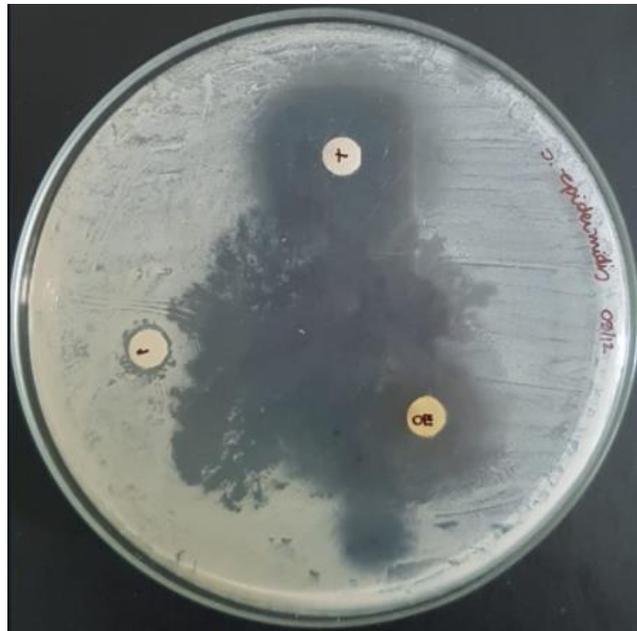


Figura 22 - Placa de *S. epidermidis* com 3 discos e seus respectivos halos de atividade, sendo um o controle positivo (+), um o controle negativo (-) e o terceiro com o óleo essencial de *N. nitidula* (OE)

MO: *Pseudomona aeruginosa* – Antibiótico utilizado: Tetraciclina (50µg/mL).  
Feito em uma placa grande.

Disco	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
+	Sim	15,0
-	Não	0,0
1	Sim	10,0

Quadro 21 - Apresentação de presença de atividade, valor do diâmetro do halo em mm e a distância entre a borda do disco e borda do halo em mm para o micro-organismo *Pseudomona aeruginosa*

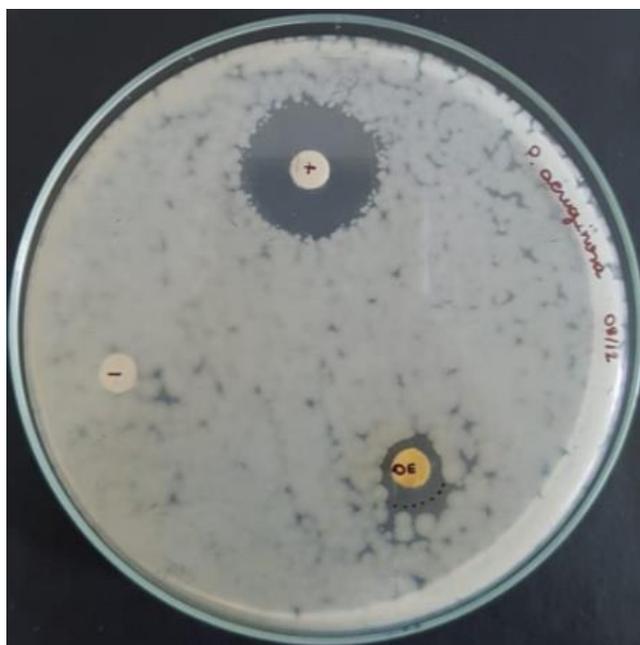


Figura 23 – Placa 1 de *P. aeruginosa* com 3 discos e seus respectivos halos de atividade, sendo um o controle positivo (+), um o controle negativo (-) e o terceiro com o óleo essencial de *N. nitidula* (OE)

MO: *Pseudomona aeruginosa* – Antibiótico utilizado: Norfloxacin (20µg/mL).

Feito em uma placa grande.

Disco	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
+	Sim	26,0
-	Não	0,0
1	Sim	12,0

Quadro 22 - Apresentação de presença de atividade, valor do diâmetro do halo em mm e a distância entre a borda do disco e borda do halo em mm para o micro-organismo *Pseudomona aeruginosa*



Figura 24 - Placa 2 de *P. aeruginosa* com 3 discos e seus respectivos halos de atividade, sendo um o controle positivo (+), um o controle negativo (-) e o terceiro com o óleo essencial de *N. nitidula* (OE)

### 6.2.5. Leitura dia 14/12/2021 (*S. epidermidis* e *S. aureus*)

Em todos os discos foram utilizados 7,0µL.

MO: *Staphylococcus aureus* – Antibiótico utilizado: Tetraciclina (50µg/mL). Feito em uma placa grande.

Disco	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
+	Sim	18,0
-	Não	0,0
1	Sim	12,0

Quadro 23 - Apresentação de presença de atividade, valor do diâmetro do halo em mm e a distância entre a borda do disco e borda do halo em mm para o micro-organismo *Staphylococcus aureus*



Figura 25 - Placa de *S. aureus* com 3 discos e seus respectivos halos de atividade, sendo um o controle positivo (+), um o controle negativo (-) e o terceiro com o óleo essencial de *N. nitidula* (OE)

MO: *Staphylococcus epidermidis* – Antibiótico utilizado: Tetraciclina (50µg/mL).

Feito em uma placa grande.

Disco	Atividade	Diâmetro do halo de inibição (mm)
+	Sim	29,0
-	Não	0,0
1	Sim	18,0

Quadro 24 - Apresentação de presença de atividade, valor do diâmetro do halo em mm e a distância entre a borda do disco e borda do halo em mm para o micro-organismo *Staphylococcus epidermidis*



Figura 26 - Placa de *S. epidermidis* com 3 discos e seus respectivos halos de atividade, sendo um o controle positivo (+), um o controle negativo (-) e o terceiro com o óleo essencial de *N. nitidula* (OE)

### 6.3. Formulação nanopartícula



Figura 27 - Formulações 1 a 4 (da esquerda para a direita) realizadas com a mistura de Croduret e Span 60 em diferentes proporções conforme demonstrado no subcapítulo “Metodologia” e suas consistências

#### 6.3.1. Formulações 1 a 4

As formulações 3 e 4 foram para leitura no aparelho Zetasizer

Amostra 3 = 0,15g croduret (3:2) 0,10g span 60

Amostra 4 = 0,2g croduret (4:1) 0,05g span 60

Amostra 3 (Croduret 3:2 Span 60) – diluída 998 $\mu$ L água:2 $\mu$ L amostra

Tamanho Partícula	645 $\pm$ 119
Índice Polidispersão (PDI)	0,742 $\pm$ 0,052

Quadro 25 - Apresentação dos valores de tamanho de partícula e índice de polidispersão da amostra 3 com a diluição 998 $\mu$ L:2 $\mu$ L

Amostra 3 (Croduret 3:2 Span 60) – diluída 3000 $\mu$ L água:2 $\mu$ L amostra

Tamanho Partícula	1005 $\pm$ 586,70
Índice Polidispersão (PDI)	0,787 $\pm$ 0,287

Quadro 26 - Apresentação dos valores de tamanho de partícula e índice de polidispersão da amostra 3 com a diluição 3000 $\mu$ L:2 $\mu$ L

Amostra 4 (Croduret 4:1 Span 60) - diluída 998µL água:2µL amostra

Tamanho Partícula	160,5 ± 2,613
Índice Polidispersão (IPD)	0,428 ± 0,068

Quadro 27 - Apresentação dos valores de tamanho de partícula e índice de polidispersão da amostra 4 com a diluição 998µL:2µL

Amostra 4 (Croduret 4:1 Span 60) - diluída 3000µL água:2µL amostra

Tamanho Partícula	219,4 ± 63,27
Índice Polidispersão (IPD)	0,404 ± 0,017

Quadro 28 - Apresentação dos valores de tamanho de partícula e índice de polidispersão da amostra 4 com a diluição 3000µL:2µL

### 6.3.2. Formulações 4.1 e 4.2

Foram realizadas duas novas formulações para leitura no Zetasizer, sendo nomeadas amostras 4.1 e 4.2

Amostra 4.1 = 0,225g Croduret (4,5:0,5) 0,025g Span 60

Amostra 4.2 = 0,175g Croduret (3,5:1,5) 0,075g Span 60

Amostra 4.1 (Croduret 4,5:0,5 Span 60) - diluída 998µL água:2µL amostra

Tamanho Partícula	152,0 ± 4,670
Índice Polidispersão (IPD)	0,374 ± 0,021

Quadro 29 - Apresentação dos valores de tamanho de partícula e índice de polidispersão da amostra 4.1 com a diluição 998µL:2µL

Amostra 4.2 (Croduret 3,5:1,5 Span 60) - diluída 998µL água:2µL amostra

Tamanho Partícula	153,9 ± 0,2887
Índice Polidispersão (IPD)	0,437 ± 0,065

Quadro 30 - Apresentação dos valores de tamanho de partícula e índice de polidispersão da amostra 4.2 com a diluição 998µL:2µL

## 7. Discussão

A primeira extração foi realizada com folhas secas da planta *N. nitidula*, que foram colhidas aproximadamente um ano antes do processo, se encontrando, então, secas. Foi observado que as folhas não apresentavam manchas características de bolor, podendo-se suspeitar de atividade antifúngica. A atividade citada não foi testada. Por se encontrarem secas, as folhas não produziram quantidade satisfatória de óleo essencial (Quadro 3), sendo necessária uma nova destilação, porém desta segunda vez com folhas frescas, cujo volume foi apresentado no Quadro 4. Pode-se observar que em alguns casos a obtenção diária foi menor e pode-se supor que isso aconteceu devido as folhas terem sido fragmentadas no dia anterior ao seu uso (descritos na coluna 6 do Quadro 4).

Durante a segunda extração de óleo essencial (a partir do dia 13/10/2021), ocorreu a presença de uma solução de aparência leitosa, possível observar nas Figuras 7, 28 e 29. Supõe-se que ocorreu a emulsão do óleo essencial com a água presente na seringa coletora, causando tal impressão. A emulsão pode ter ocorrido devido ao aquecimento da água presente na seringa coletora do aparelho destilador e, em contato com o óleo essencial que gotejava do condensador, acabou preparando a base da emulsão, que se solidificou ao entrar em contato com a superfície fria da pipeta de Pasteur e do frasco acondicionador do óleo essencial (que se encontrava em geladeira para armazenamento).

Embora não fosse possível limpar a pipeta de Pasteur e a seringa coletora com água quente e detergente, foi possível retirar a camada amarelada com acetona. É possível que tal alteração no óleo essencial obtido possa ter surgido devido falhas de manuseio do aparelho destilador, como a desatenção ao controle de temperatura do condensador presente no topo do aparelho.



Figura 28 - Pipeta de Pasteur de vidro com camada amarela que surgiu na seringa coletora do aparelho destilador a partir do dia 13 e a partir de 3h do processo de extração



Figura 29 - Seringa coletora do aparelho destilador com camada formada durante o processo de extração a partir do dia 13 e a partir de 3h do processo

Quanto à atividade apresentada pelo óleo essencial com relação aos micro-organismos escolhidos, o teste realizado foi o Teste de Sensibilidade em Disco, que foi inicialmente idealizado por Bauer (BAUER *et al.*, 1966; SEJAS *et al.*, 2003), chamado método de disco-difusão, que consiste no uso de um disco de

papel-filtro impregnado com antibiótico em uma placa de ágar semeada com a bactéria determinada. Com esta preparação, por meio de difusão o antibiótico forma um halo que indica a inibição do crescimento bacteriano. A medição do halo é realizada com uma régua ou com um paquímetro calibrado após a incubação da placa durante a noite. É anotado o valor do diâmetro do halo, considerando-se o disco de papel filtro utilizado (BAUER *et al.*, 1966).

Na presente pesquisa, os primeiros discos foram realizados em triplicata para verificação de presença de atividade, enquanto os seguintes foram realizados com apenas um disco contendo óleo essencial para melhor medição dos halos de atividade presente nas placas, visto que ocorreram casos de mistura de atividade entre os halos.

De acordo com o tamanho formado do halo, é possível classificar o micro-organismo em “Resistente” (representado pela letra R), “Intermediário” (I) ou “Sensível” / “Susceptível” (S) (SEJAS *et al.*, 2003), segundo os valores das tabelas apresentadas nas Figuras 30, 31 e 32, retiradas de (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2020).

O micro-organismo é classificado como “S” quando o diâmetro da sua zona de inibição apresenta valor igual ou superior ao definido na tabela, indicando que o micro-organismo é inibido pela concentração usualmente utilizada do antibiótico, quando este é empregado no tratamento de infecções, resultando então em provável eficácia clínica. A categoria “I” indica que o diâmetro do halo de inibição apresenta valor intermediário aos apresentados na tabela e a classificação “R” indica que o diâmetro do halo de inibição se encontra igual ou abaixo aos apresentados nas tabelas das figuras 30 a 32, indicando que há resistência microbiana e/ou o agente antimicrobiano não apresente eficácia clínica comprovada (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2020). O valor também pode ser indicado pela concentração mínima inibitória (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2020), porém para o presente trabalho, o valor considerado foi o de diâmetro de zona de inibição.

**Table 2A. Enterobacteriales (Continued)**

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm				Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL				Comments
			S	SDD	I	R	S	SDD	I	R	
<b>MACROLIDES</b>											
Inv.	Azithromycin	15 µg	≥ 13	—	—	≤ 12	≤ 16	—	—	≥ 32	(43) <i>S. enterica</i> ser. Typhi only; breakpoints are based on MIC distribution data and limited clinical data. For <i>S. flexneri</i> and <i>S. sonnei</i> , see Appendix G, Table G1.
<b>TETRACYCLINES</b>											
(44) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and minocycline. However, some organisms that are intermediate or resistant to tetracycline may be susceptible to doxycycline, minocycline, or both.											
C	Tetracycline	30 µg	≥ 15	—	12–14	≤ 11	≤ 4	—	8	≥ 16	
O	Doxycycline	30 µg	≥ 14	—	11–13	≤ 10	≤ 4	—	8	≥ 16	
O	Minocycline	30 µg	≥ 16	—	13–15	≤ 12	≤ 4	—	8	≥ 16	
<b>QUINOLONES AND FLUOROQUINOLONES for Enterobacteriales except <i>Salmonella</i> spp. (Please refer to Glossary I.)</b>											
B	Ciprofloxacin	5 µg	≥ 26	—	22–25*	≤ 21	≤ 2	—	0.5*	≥ 1	(45) Breakpoints for ciprofloxacin are

Figura 30 - Tabela indicando o uso de antibióticos e seus valores para classificação de micro-organismos de acordo com o tamanho do halo de inibição medido em milímetros (mm), sendo considerados, para esta tabela, o micro-organismo *Escherichia coli*, considerando o uso do antibiótico padronizado tetraciclina

**Table 2B-1. Pseudomonas aeruginosa (Continued)**

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL			Comments
			S	I	R	S	I	R	
<b>AMINOGLYCOSIDES</b>									
A	Gentamicin	10 µg	≥ 15	13–14 <sup>A</sup>	≤ 12	≤ 4	8 <sup>A</sup>	≥ 16	
A	Tobramycin	10 µg	≥ 15	13–14 <sup>A</sup>	≤ 12	≤ 4	8 <sup>A</sup>	≥ 16	
B	Amikacin	30 µg	≥ 17	15–16 <sup>A</sup>	≤ 14	≤ 16	32 <sup>A</sup>	≥ 64	
O	Netilmicin	30 µg	≥ 15	13–14 <sup>A</sup>	≤ 12	≤ 8	16 <sup>A</sup>	≥ 32	
<b>FLUOROQUINOLONES</b>									
B	Ciprofloxacin	5 µg	≥ 25	19–24 <sup>A</sup>	≤ 18	≤ 0.5	1 <sup>A</sup>	≥ 2	(23) Breakpoints are based on a dosage regimen of 400 mg IV administered every 8 h.
B	Levofloxacin	5 µg	≥ 22	15–21 <sup>A</sup>	≤ 14	≤ 1	2 <sup>A</sup>	≥ 4	(24) Breakpoints are based on a dosage regimen of 750 mg administered every 24 h.
O	Lomefloxacin	10 µg	≥ 22	19–21 <sup>A</sup>	≤ 18	≤ 2	4 <sup>A</sup>	≥ 8	(25) For testing and reporting of urinary tract isolates only.
O	Norfloxacin	10 µg	≥ 17	13–16	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16	See comment (25).
O	Ofloxacin	5 µg	≥ 16	13–15 <sup>A</sup>	≤ 12	≤ 2	4 <sup>A</sup>	≥ 8	
O	Gatifloxacin	5 µg	≥ 18	15–17 <sup>A</sup>	≤ 14	≤ 2	4 <sup>A</sup>	≥ 8	

Abbreviations: ATCC®, American Type Culture Collection; CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; CAT, colistin agar test; CBDE, colistin broth disk elution; I, intermediate; MHA, Mueller-Hinton agar; MIC, minimal inhibitory concentration; PK-PD, pharmacokinetic-pharmacodynamic; QC, quality control; R, resistant; S, susceptible.

Figura 31 - Tabela indicando o uso de antibióticos e seus valores para classificação de micro-organismos de acordo com o tamanho do halo de inibição medido em milímetros (mm), sendo considerados, para esta tabela, o micro-organismo *Pseudomonas aeruginosa* e o antibiótico norfloxacin

**Table 2C. Staphylococcus spp. (Continued)**

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Staphylococcus spp. Indications	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm				Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL				Comments
				S	SDD	I	R	S	SDD	I	R	
<b>MACROLIDES</b>												
(26) Not routinely reported on organisms isolated from the urinary tract.												
A	Azithromycin	All staphylococci	15 µg	≥ 18	—	14–17	≤ 13	≤ 2	—	4	≥ 8	
A	clarithromycin		15 µg	≥ 18	—	14–17	≤ 13	≤ 2	—	4	≥ 8	
A	erythromycin		15 µg	≥ 23	—	14–22	≤ 13	≤ 0.5	—	1–4	≥ 8	
O	Dirithromycin		15 µg	≥ 19	—	16–18	≤ 15	≤ 2	—	4	≥ 8	
<b>TETRACYCLINES</b>												
(27) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and minocycline. However, some organisms that are intermediate or resistant to tetracycline may be susceptible to doxycycline, minocycline, or both.												
B	Tetracycline	All staphylococci	30 µg	≥ 19	—	15–18	≤ 14	≤ 4	—	8	≥ 16	
B	Doxycycline		30 µg	≥ 16	—	13–15	≤ 12	≤ 4	—	8	≥ 16	
B	Minocycline		30 µg	≥ 19	—	15–18	≤ 14	≤ 4	—	8	≥ 16	See comment (26).
<b>FLUOROQUINOLONES</b>												
(28) <i>Staphylococcus</i> spp. may develop resistance during prolonged therapy with quinolones. Therefore, isolates that are initially susceptible may become resistant within 3 to 4 days after initiation of therapy. Testing of repeat isolates may be warranted.												

Figura 32 - Tabela indicando o uso de antibióticos e seus valores para classificação de micro-organismos de acordo com o tamanho do halo de inibição medido em milímetros (mm), sendo considerados, para esta tabela, os micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*, considerando o antibiótico padronizado tetraciclina.

De acordo com os valores obtidos e apresentados no tópico 5.1.2, para a bactéria *E. coli*, com seus resultados apresentados nos quadros 9, 10 e 18 e comparados os valores com a Figura 30, a bactéria apresentou atividade classificada como “R” (resistente), assim como a *P. aeruginosa*, com seus

valores apresentados nos quadros 6, 7, 13, 14, 15, 21 e 22 e comparados à Figura 31, com exceção do quadro 16, cujos resultados deram “S” (sensível) e “I” (intermediária). Quanto à *S. aureus*, os valores apresentados nos quadros 8, 11, 19 e 23 e comparados à Figura 32, indicaram atividade “R”. A bactéria *S. epidermidis* também teve seus resultados comparados à Figura 32, porém nos quadros 12 e 24 apresentou atividade classificada como “S” nos testes realizados no disco e nos quadros 17 e 20, atividade “I”.

Para conferência de valor, é sabido que o disco originalmente utilizado na pesquisa de (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2020) possui 6mm de diâmetro, enquanto o disco utilizado neste trabalho possuía 8mm de diâmetro. Com isso, o valor da distância da borda do disco até a borda do halo de inibição foi considerado, para que houvesse menos interferências possíveis no caso da bactéria *S. epidermidis*.

As placas contendo o micro-organismo *S. aureus* não apresentaram halos bem definidos ao redor dos discos contendo o óleo essencial (é possível observar o fenômeno nas Figuras 10, 13, 21, 25). Devido a este motivo, os volumes iniciais de 10µL. de OE e controles foram alterados durante os testes de sensibilidade em disco, para evitar problemas em que o óleo estivesse escorrendo pelo ágar. Valores menores do que 7,0µL também foram testados nos discos, porém ele não se mantinha completamente úmido, possuindo partes que permaneciam secas após a aplicação. Como a diminuição do volume de óleo essencial nos discos não alterou a irregularidade dos halos, supôs-se, então, que o mesmo possa ter volatilizado, causando tal situação.

Das quatro nanoformulações preparadas, apenas as de número três e quatro foram consideradas para leitura no aparelho Zetasizer devido, inicialmente, sua aparência mais aquosa quando comparadas com as de número um e dois.

Após leitura e obtenção dos resultados apresentados, mais duas formulações foram preparadas (4.1 e 4.2), com proporções semelhantes ao preparo 4. Quando os valores foram comparados aos da formulação 3, observou-se que, além do tamanho da partícula ser menor, o índice de polidispersão também o era, o que indica maior homogeneidade da solução.

## **8. Conclusão**

A pesquisa teve como intuito avaliar a atividade biológica do óleo essencial de *Nectandra nitidula* para que este pudesse ser utilizado em formulações farmacêuticas e este foi alcançado. Para tal, definiram-se alguns objetivos específicos, como a destilação do óleo essencial por arraste a vapor, verificando-se que apresentou ótimos resultados com a planta fresca ao invés de seca e a análise microbiológica por teste de sensibilidade em disco dos micro-organismos *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis*. Tal análise permitiu concluir que apenas esta última bactéria se mostrou sensível ao óleo essencial, sendo as outras três resistentes e/ou intermediárias à atividade do OE.

Quanto à formulação preparada, a de número 4 se apresentou, de acordo com os resultados, mais propensa a ser considerada nanoestruturada, sendo, por este motivo, realizada mais duas formulações com proporções de tensoativos semelhantes.

## **9. Considerações finais**

Para pesquisas futuras, um teste a ser realizado é o de cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas, para identificação dos compostos presentes no óleo essencial estudado neste trabalho apresentado, além da pesquisa de concentração mínima inibitória com o micro-organismo *S. epidermidis*, já que o mesmo apresenta sensibilidade quando exposto ao OE de

*N. nitidula* concentrado. Além disso, aumentar a gama de micro-organismos a serem testados, com semelhanças estruturais à *S. epidermidis*, por exemplo.

## **10. Referências**

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Investigação E Controle De Bactérias Multirresistentes. Brasil, p. 1–21, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Módulo 5 - Teste de**

**Sensibilidade aos Antimicrobianos.** [S. l.], 2008. Available at: [https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo5/interpretacao.htm](https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/interpretacao.htm). Acesso em: 14 mar. 2022.

ALBA, P. G.; SANTOS, B. Biopesticida com base em óleos essenciais. **Semana Acadêmica - Revista Científica**, Belho Horizonte, Brasil, 2018.

ALLEN, C. K. Notes on Lauraceae of Tropical America I. The Generic Status of Nectandra, Ocotea and Pleurothyrium. *In: PHYTOLOGIA*. New York: [s. n.], 1966. v. 13, p. 221–231.

ALVES, F. M.; SARTORI, Â. L. B. Nectandra Rol. ex Rottb. (Lauraceae) no Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 118–129, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1590/s0102-33062009000100015>

ANDREI, P.; COMUNE, A. P. Del. Aromaterapia e suas aplicações. **Cadernos - Centro Universitário São Camilo**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 57–68, 2005.

APOLINÁRIO, J. M. dos S. da S. Características Classificação e Patogenicidade do Staphylococcus Aureus. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, [s. l.], v. 2, n. 2, 2021. Available at: <https://doi.org/10.51161/rem/s/1211>

AZEREDO, C. M. O. *et al.* In vitro biological evaluation of eight different essential oils against Trypanosoma cruzi , with emphasis on Cinnamomum verum essential oil. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, [s. l.], p. 1–8, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-309>

BADKE, M. R. *et al.* Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto e Contexto Enfermagem**, Florianópolis, v. 21, n. 2, p. 363–370, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0104-07072012000200014>

BAITELLO, J. B. *et al.* **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: FAPESP - Rima, 2003.

BARREIRO, E. J. What is hidden in the biodiversity? The role of natural products and medicinal chemistry in the drug discovery process. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 91, p. 1–6, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190306>

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300012>

BARROSO, G. M. *et al.* **Sistemática de angiospermas do Brasil**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002.

BAŞER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. (org.). **Handbook of Essential Oils - Science, Technology and Applications**. 3. ed. [S. l.]: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1201/9781351246460>

BATTISTI, C. *et al.* Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, p. 338–348, 2013.

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

BLACK, J. G.; BLACK, L. J. **Microbiologia - Fundamentos e Perspectivas**. 10. ed. Rio de Janeiro: Grupo Editorial Nacional | Guanabara Koogan, 2020.

BROWN, M. M.; HORSWILL, A. R. Staphylococcus epidermidis — Skin friend or foe? **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 1–6, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009026>

BUCKLE, J. **Clinical aromatherapy: Essential oils in healthcare**. 3. ed. [S. l.]: Elsevier, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/C20120025781>

BÜTTNER, H.; MACK, D.; ROHDE, H. Structural basis of Staphylococcus epidermidis biofilm formation: Mechanisms and molecular interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. FEB, p. 1–15, 2015. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00014>

CERQUEIRA, A. S. **Nanoformulação do óleo essencial de Alecrim-Pimenta (Lippia sidoides) na ensilagem de milho (Zea mays L.)**. 67 f. 2018. - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Brasil, 2018.

CHANDERBALI, A. S.; WERFF, H. Van Der; RENNER, S. S. Phylogeny and Historical Biogeography of Lauraceae: Evidence from the Chloroplast and

Nuclear Genomes All use subject to JSTOR Terms and Conditions AND HISTORICAL BIOGEOGRAPHY OF LAURACEAE: EVIDENCE FROM THE CHLOROPLAST AND NUCLEAR GENOMES<sup>1</sup>. **Annals of Missouri Botanical Gardens**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 104–134, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **About Clinical Laboratory Standards Institute**. [S. l.], 2022. Available at: <https://clsi.org/about/>. Acesso em: 14 mar. 2022.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-ED30**. [S. l.: s. n.], 2020. v. 40

COSTA, B. S. **Superbactérias e o desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antimicrobianos**. 57 f. 2019. - Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, Brasil, 2019.

DUARTE, M. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência**, [s. l.], v. 7, p. 16, 2006.

FERREIRA, É. C. As Propriedades Medicinais E Bioquímicas Da Planta *Stryphnodendron Adstringens* “Barbatimão”. **Biológicas & Saúde**, [s. l.], v. 3, n. 11, p. 14–32, 2013. Available at: <https://doi.org/10.25242/886831120139>

FIRMO, W. da C. A. *et al.* Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisas**, São Luís, v. 18, n. Especial, p. 90–95, 2011.

GARCIA, W. J. V.; BAQUERO, L. C. P.; RODRÍGUEZ, P. H.-. Potencial antimicrobiano de extractos de plantas medicinales y sus mezclas frente a bacterias asociadas con conjuntivitis. **Nova**, [s. l.], v. 19, n. 36, p. 95–108, 2020. Available at: <https://doi.org/10.22490/24629448.5294>

GONZÁLEZ, J. O. W. *et al.* Essential oils nanoformulations for stored-product pest control - Characterization and biological properties. **Chemosphere**, [s. l.], v. 100, p. 130–138, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.056>

JOLY, C. A. *et al.* Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista**

USP, [s. l.], n. 89, p. 114–133, 2011. Available at: <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9036.v0i89p114-133>

KÖNIG, S. **Óleos Essenciais: Eventos Adversos e Segurança na Indicação**. 52 f. 2020. - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, Brasil, 2020.

KOSTERMANS, A. J. G. H. **Reinwardtia**. [S. l.]: Herbarium -Bogoriense, Kebun Raya Indonesia, 1957. v. 4 pt.2

LIETAVA, J. Medicinal plants in a Middle Paleolithic grave Shanidar IV ? **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 35, p. 263–266, 1992.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras - Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil - Volume 2**. 2. ed. São Paulo: Editora Plantarum, 1998.

MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Linal. **Floresta e ambiente**, [s. l.], v. 8, p. 195–206, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. 1. ed. Brasília - DF: [s. n.], 2006.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Convenção sobre Diversidade Biológica. *In*: CONV. SOBRE DIVERS. BIOLÓGICA, 1993. **Convenção sobre Diversidade Biológica**. [S. l.: s. n.], 1993. Available at: <https://doi.org/10.1896/1413-4705.12.3.157a>

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Fauna e Flora**. [S. l.], [s. d.]. Available at: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade/fauna-e-flora>. Acesso em: 15 nov. 2021.

MONTEFUSCOLI, A. R. *et al.* Design and development of aqueous nanoformulations for mosquito control. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 113, n. 2, p. 793–800, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3710-y>

MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. Staphylococcus aureus biofilm: a complex developmental organism. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 104, n. 3, p. 365–

376, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.13634>

NASCIMENTO, E. D. do. **Resistência bacteriana em reservatórios do semiárido brasileiro: Caracterização, ações para vigilância ambiental, prevenção e educação em saúde**. 2016. - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil, 2016.

OLIVEIRA, A. P. **Nanoformulações à base de óleo essencial de Lippia sidoidese timol para o manejo de populações de Sitophilus zeamais**. 41 f. 2016. - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão - Sergipe, Brasil, 2016.

OLIVEIRA, W. F. *et al.* Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis infections on implants. **Journal of Hospital Infection**, [s. l.], v. 98, n. 2, p. 111–117, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.11.008>

OTTO, M. Staphylococcus epidermidis - The “accidental” pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 555–567, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>

PAGANINI, T.; SILVA, Y. F. e. O Uso Da Aromaterapia No Combate Ao Estresse. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 43–49, 2014. Available at: <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v18i1.2014.5157>

POMEROY, E. *et al.* New Neanderthal remains associated with the "flower burial" at Shanidar Cave. **Antiquity**, United Kingdom, v. 94, n. 373, p. 11–26, 2020. Available at: <https://doi.org/10.15184/aqy.2019.207>

QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. Lauraceae jussieu na reserva ecológica de Macaé de Cima, Município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguesia**, [s. l.], v. 53, n. 82, p. 59–121, 2002. Available at: <https://doi.org/10.1590/2175-78602002538204>

RIOS, L. L. *et al.* Isolamento, identificação e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos de bactérias patogênicas em vestimentas usadas por profissionais de saúde em ambiente hospitalar. **Brazilian Journal of Health**, Curitiba, v. 3, n. 5, p. 12999–13027, 2020. Available at: <https://doi.org/10.34119/bjhrv3n5-131>

ROHWER, J. G. Lauraceae. *In*: KUBITZKI, K.; ROHWER, J. G.; BITTRICH, V.

(org.). **Flowering Plants - Dicotyledons**. 1. ed. [S. l.]: Springer, Berlin, Heidelberg, 1993. v. 2, p. 366–391. Available at: <https://doi.org/10.1007/978-3-662-02899-5>

ROHWER, J. G.; KUBITZKI, K. Ecogeographical Differentiation in *Nectandra* (Lauraceae), and its Historical Implications. **Botanica Acta**, [s. l.], v. 106, n. 1, p. 88–99, 1992. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1993.tb00342.x>

ROHWER, Jens G; RICHTER, H. G.; WERFF, H. van der. Two New Genera of Neotropical Lauraceae and Critical Remarks on the Generic Delimitation. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 388–400, 1991.

SCHNAUBELT, K. **The Healing Intelligence of Essential Oils - The Science of Advanced Aromatherapy**. Rochester, Vermont / Toronto, Canada: Healing Arts Press, 2011.

SEJAS, L. M. *et al.* Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s. l.], v. 39, n. 1, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1590/s1676-24442003000100006>

SOLECKI, R. S. Prehistory in Shanidar Valley, Northern Iraq. **Science**, [s. l.], v. 139, n. 3551, p. 179–193, 1963.

SOLECKI, R. S. Shanidar IV , a Neanderthal Flower Burial in Northern Iraq. **Science**, [s. l.], v. 190, n. 4217, p. 880–881, 1967.

SOUZA, D. R.; RODRIGUES, E. C. A. M. de S. Plantas medicinais: indicação de raizeiros para o tratamento de feridas. **Revista Brasileira em promoção da Saúde**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 197–203, 2016. Available at: <https://doi.org/10.5020/18061230.2016.p197>

SURESH, M. K.; BISWAS, R.; BISWAS, L. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 309, n. 1, p. 1–12, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.11.002>

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology - An Introduction**. [S. l.]: Pearson, 2020.

TRANCOSO, M. D. Projeto Óleos Essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano. **Revista Práxis**, [s. l.], v. 5, n. 9, p. 89–95, 2013.

TSUCHIYA, K. K.; NASCIMENTO, M. D. J. P. do. Terapias complementares : uma proposta para atuação do enfermeiro. **Revista de Enfermagem UNISA**, [s. l.], v. 3, p. 37–42, 2002.

WEISS, E. A. **Essential Oil Crops**. [S. l.]: CAB International, 1997.

WERFF, H. van der. A Key to the Genera of Lauraceae in the New World. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 377–387, 1991.

WERFF, H. van der; RICHTER, H. . G. . Toward an Improved Classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 409–418, 1996.

WOLFFENBÜTTEL, A. N. Óleos Essenciais. **CRQ-V ano XI**, [s. l.], n. 105, p. 6–7, 2007.