

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

Ligia Arcanjo Gonçalves

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES NANOESTRUTURADAS CONTENDO
FRAÇÃO ACETATO ETILÊNICA DE GALHOS DE *Protium spruceanum* E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Ouro Preto

2017

Ligia Arcanjo Gonçalves

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES NANOESTRUTURADAS CONTENDO
FRAÇÃO ACETATO ETILÊNICA DE GALHOS DE *Protium spruceanum* E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

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

Orientador: MSc. Tatiane Roquete Amparo

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza

Ouro Preto

2017

G635d Gonçalves, Lígia Arcanjo.
Desenvolvimento de formulações nanoestruturadas contendo fração acetato etilênica de galhos de *Protium spruceanum* e a avaliação da atividade antimicrobiana [manuscrito] / Lígia Arcanjo Gonçalves. - 2017.

60f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: MSc. Tatiane Roquete Amparo.

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. *Protium spruceanum*. 2. Nanoemulsão. 3. Lipossoma. 4. Etossoma. 5. Atividade antimicrobiana. I. Amparo, Tatiane Roquete. II. Souza, Gustavo Henrique Bianco de. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 615.3

Catálogo: ficha@sisbin.ufop.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

TERMO DE APROVAÇÃO

Desenvolvimento de formulações nanoestruturadas contendo fração acetato etilênica de galhos de *Protium spruceanum* e avaliação da atividade antimicrobiana

Trabalho de conclusão de Curso defendido por **LIGIA ARCANJO GONÇALVES**, matrícula 11.2.2042 em 22 de agosto de 2017, e aprovado pela comissão examinadora:

Profª. Msc. Tatiane Roquete Amparo
DEFAR-EF-UFOP, orientadora

Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza
DEFAR-EF-UFOP, co-orientador

Msc. Janaina Brandão Seibert
PPG BIOTECNOLOGIA-UFOP

Prof. Dr. Luiz Fernando Medeiros Teixeira
DEACL-EF-UFOP

AGRADECIMENTOS

Aos meu pais e ao meu irmão Felipe, que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui, por me apoiarem nas dificuldades e tornarem o meu sonho realidade. Tudo o que sou devo à vocês.

À minha orientadora, Tatiane, pela paciência, ensinamentos e disposição em me ajudar.

Ao Prof. Gustavo e ao Laboratório de Fitotecnologia pela oportunidade. À Janaína e ao Prof. Orlando, por toda ajuda concedida para realização deste trabalho. Ao Laboratório de Microbiologia, por disponibilizar a estrutura necessária para os testes de atividade antimicrobiana.

Aos amigos do 11.2, que me acompanharam desde o princípio da graduação e me deram forças para continuar, em especial ao Ruan, Mariana, Pryscila, Danielli, Roberta e Rosane.

Ao Marcus, pela dedicação e por me incentivar a ser sempre melhor. Sem dúvidas, chegar até aqui foi muito mais fácil com você por perto.

Aos amigos da Escola de Farmácia, pelos cafés e bate-papos no CA, por aguentarem meus dramas e tornarem as dificuldades mais leves. Em especial Campolina, Fernanda, João, Mariana, Maria Fernanda, Maria e Paula, por trazerem luz aos meus dias.

À República Muvuca, onde eu encontrei um lar e uma segunda família, que sempre me apoiou e me sustentou em todos os momentos, vocês foram fundamentais para a conclusão desta etapa.

À todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho, muito obrigada!

RESUMO

Desenvolvimento de formulações nanoestruturadas contendo fração acetato etilênica de galhos de *Protium spruceanum* e avaliação da atividade antimicrobiana

A espécie *P. spruceanum* é uma árvore pertencente à família Burseraceae, popularmente conhecida como breu e usada como anti-inflamatório e repelente para insetos. Os extratos desta espécie também possuem propriedades antimicrobianas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo a fração acetato etilênica a que possui maior atividade. As nanoformulações destacam-se como novas alternativas para o carreamento de fármacos, por possibilitarem uma melhor resposta farmacológica, já que possuem um tempo de ação mais longo no sítio-alvo e diminuem os efeitos adversos causados pelo fármaco. O presente estudo apresenta a avaliação da atividade antimicrobiana de nanoemulsões, lipossomas e etossomas desenvolvidos utilizando a fração acetato etilênica de *P. spruceanum*. As nanoemulsões foram preparadas pelo método de inversão de fases e aquelas que permaneceram estáveis após 24 horas pela análise macroscópica, foram caracterizadas por medida do tamanho de partícula e índice de polidispersão (IPD). A nanoemulsão O/A apresentou tamanho médio igual a $81,58 \pm 0,302$ nm e IPD igual a $0,124 \pm 0,012$, já a formulação A/O apresentou tamanho de $180,8 \pm 15,3$ nm e IPD $0,263 \pm 0,063$. Essas nanoformulações demonstraram relativa estabilidade quando caracterizadas por tamanho e índice de polidispersão das partículas, porém, não houve resposta para a atividade antimicrobiana pela técnica de microdiluição em caldo. Os lipossomas e etossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico e método à frio, porém, não se apresentaram estáveis na presença da fração. Sugere-se que a ausência de reprodutibilidade da atividade da fração esteja relacionada com a interação dos compostos bioativos com os tensoativos utilizados. No entanto, ainda são necessários mais estudos sobre a compatibilidade da fração com os componentes da formulação.

Palavras-chave: *Protium spruceanum*, nanoemulsão, lipossoma, etossoma, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Development of nanostructured formulations loaded ethyl acetate fraction from *Protium spruceanum* branches and antimicrobial activity evaluation

P. spruceanum species is a tree which belongs to the Burseraceae family, it's popularly known as Breu and used as anti-inflammatory and insect repellent. Its extracts also have antimicrobial properties against Gram positive and Gram negative bacterias, and the ethyl acetate fraction has the highest activity. The nanoformulations are new alternatives for drug delivery because they improve the activity results since they have a longest action time on the pharmacological target and make decrease in the adverse effects caused by the drugs. The current study show the evaluation of the antimicrobial activity of nanoemulsions, liposomes and etosomes developed loaded ethyl acetate fraction from *P. spruceanum*. Nanoemulsions were prepared by the phase inversion method and those that remained stable after 24 hours by macroscopic analysis were characterized by measurement of particle size and polydispersity index (PDI). O/W nanoemulsion showed a size $81,58 \pm 0,302$ nm and PDI $0,124 \pm 0,012$, while W/O formulation has a particle size $180,8 \pm 15,3$ nm and PDI $0,263 \pm 0,063$. These nanoformulations showed relative stability when characterized by size and polydispersity index of the particles, however, there was no response to antimicrobial activity by broth microdilution method. Liposomes and etosomes were prepared by the lipid film hydration method and cold method, but they weren't stable into the fraction's presence. The suggestion is that the reproducibility absence of the fraction activity is related to the interaction of bioactive compounds with the surfactants that were used. However, more studies about the fraction compatibility with the others formulation's compounds are still necessary.

Keywords: *Protium spruceanum*, Nanoemulsion, Liposome, Etosome, Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Frutos, caule e folhas de <i>Protium spruceanum</i>	15
Figura 2 - Estrutura de uma nanoemulsão O/A	20
Figura 3 – Estrutura de um lipossoma.....	22
Figura 4 – Método de hidratação do filme lipídico	29
Figura 5 - Gráfico da formulação 20 A/O de distribuição de tamanho por intensidade	44
Figura 6 - Gráfico da distribuição de tamanho por intensidade da nanoformulação O/A 2 nos 1 (a), 7 (b), 14 (c), 21 (d) e 28 (e) dias após sua preparação	48
Figura 7 - Gráfico de distribuição de tamanho de partícula por intensidade da formulação A/O 20 nos 1 (a) e 7 (b) dias após sua preparação	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medida de tamanho e polidispersão (IPD) das partículas das formulações A/O estáveis após 24 horas de preparação	44
Tabela 2 - Medida do tamanho (nm) e do índice de polidispersão das partículas (IPD) durante 28 dias	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Formulações óleo em água (O/A)	24
Quadro 2 - Composição da formulação O/A com fração acetato etilênica de galhos de <i>P. spruceanum</i>	25
Quadro 3 - Formulações água em óleo (A/O)	26
Quadro 4 - Composição da formulação A/O com fração acetato etilênica de galhos de <i>P. spruceanum</i>	28
Quadro 5 - Composição do lipossoma	30
Quadro 6 – Etossomas.....	30
Quadro 7 - Formulações O/A desenvolvidas e suas respectivas características macroscópicas após 24h da preparação.....	37
Quadro 8 - Formulações A/O desenvolvidas e suas respectivas características macroscópicas após 24h da preparação.....	39
Quadro 9 - Etossomas desenvolvidos e suas características após 24h da preparação	45

LISTA DE ABREVIATURAS

A/O – Água em óleo
AcOEt – Acetato de etila
CIM – Concentração inibitória mínima
CTT – Cloreto de trifeniltetrazólio
DLS – Espalhamento dinâmico da luz
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA - Ácido desoxirribonucleico
EEB – Extrato etanólico bruto
EHL – Equilíbrio hidrófilo-lipofílico
EtOH – Etanol
HMeOH – Hidrometanólica
IPD – Índice de polidispersão de partículas
O/A – Óleo em água
PBS – Tampão Fosfato Salino
RNA – Ácido ribonucleico
rpm – Rotações por minuto
UFC – Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 <i>Protium spruceanum</i> (Burseraceae).....	14
3.2 Estudos de antimicrobianos de origem vegetal	16
3.3 Formulações nanoestruturadas.....	19
3.3.1 Nanoemulsões	19
3.3.2 Lipossomas	21
3.3.3 Etossomas.....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 Desenvolvimento de nanoformulações	24
4.1.1 Nanoemulsões O/A	24
4.1.2 Nanoemulsões A/O	25
4.1.3 Lipossomas e etossomas	29
4.2 Caracterização das formulações	32
4.3 Atividade antimicrobiana	32
4.4 Ensaio de liberação	33
4.4.1 Quantificação de fenólicos totais.....	33
4.4.2 Determinação das condições sink (solubilidade).....	34
4.4.3 Teste de liberação por diálise.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1 Desenvolvimento das nanoformulações.....	36
5.1.1 Nanoemulsões	36
5.1.2 Lipossomas e etossomas	44
5.2 Caracterização das formulações	46
5.3 Atividade antimicrobiana	49
5.4 Ensaio de liberação	50
5.4.1 Determinação das condições sink (solubilidade).....	50
5.4.2 Ensaio de liberação	52
6 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

As substâncias presentes em extratos e óleos essenciais são produzidas pelas plantas como uma consequência do seu metabolismo secundário, sendo que as propriedades antimicrobianas destes produtos naturais são utilizadas popularmente há séculos (DUARTE, 2006).

O aumento da resistência de microrganismos aos antibióticos atuais tem dificultado o tratamento de infecções e, vem se tornando um dos principais problemas de saúde pública. Em vista desse cenário, a pesquisa de antimicrobianos derivados de fontes naturais, incluindo plantas, tem se tornado cada vez mais importante (DUARTE, 2006). Dessa forma, destaca-se a importância de estudos que envolvam a busca de novas abordagens terapêuticas para o tratamento de infecções.

A espécie *Protium spruceanum*, pertencente à família Burseraceae, é uma árvore tropical popularmente conhecida como breu. Estas árvores são encontradas em todo território brasileiro, mas principalmente, na Amazônia, Mata Atlântica e no Cerrado. Seus extratos são utilizados na medicina popular por suas propriedades anti-inflamatórias e como repelentes para insetos (RODRIGUES et al, 2013).

Extratos de *P. spruceanum* demonstraram atividade antimicrobiana contra 20 microrganismos. Esta ação foi relacionada ao teor de taninos e flavonoides presentes na planta. A fração acetato etilênica obtida a partir do extrato de galhos, apresenta a melhor atividade contra os microrganismos *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus aureus* (AMPARO, 2016).

Além da pesquisa de novos antimicrobianos, se faz necessário novos métodos para reduzir a resistência bacteriana. O uso da nanotecnologia tornou-se cada vez mais utilizada para aplicações médicas e é uma alternativa para melhorar a eficácia dos antimicrobianos (WEBSTER, 2012). Exemplos de sistemas nanoestruturados são: nanoesferas, nanocápsulas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas, microemulsões, lipossomas, etossomas e niossomas (GUTERRES et al, 2007).

As nanoemulsões são formulações com duas fases (água e óleo) que são estabilizadas pela adição de surfactantes. A estrutura da nanoemulsão auxilia a ação do antimicrobiano, pois as gotículas de óleo se fundem com a parede celular

bacteriana ou com envelope viral, desestabilizando o envelope lipídico do organismo e iniciando a ruptura do patógeno (HAMOUDA et al, 2001).

Os lipossomas são veículos que se formam espontaneamente quando certos lipídeos são hidratados em meio aquoso. Estes veículos são formados por uma partícula que contém um volume aquoso aprisionado por uma ou mais bicamadas de lipídeos naturais ou sintéticos. Os fármacos, dependendo da sua lipofilicidade, podem ser encapsulados na sua camada lipídica ou no seu volume aquoso (SHARMA & SHARMA, 1997).

Existem evidências de que as nanoemulsões e os lipossomas melhoram a eficácia dos antimicrobianos (DONSI et al, 2012; LIN et al, 2012; PINTO-ALPHANDARY et al, 2000).

Dessa forma, diante da necessidade de novos antimicrobianos e ausência de estudos sobre formulações com frações de *P. spruceanum*, tornam-se necessários tais estudos para contribuir com as pesquisas de novas formas de tratamento para doenças infecciosas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de formulações nanoestruturadas desenvolvidas contendo a fração acetato etilênica de galhos de *P. spruceanum*.

2.2 Objetivos Específicos

Desenvolver as nanoformulações a partir da fração acetato etilênica;

Caracterizar e indicar estabilidade das formulações obtidas, por análise macroscópica, medida de tamanho e índice de polidispersão de partículas;

Aplicar método para avaliar a atividade antimicrobiana das formulações estáveis e da fração AcOEt com DMSO.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Protium spruceanum* (Burseraceae)

A espécie *Protium spruceanum* pertence à família Burseraceae, que abrange em torno de 16 gêneros com aproximadamente 800 espécies (BANDEIRA, 2002). É uma família de árvores secretoras de resina e exsudatos ricos em substância voláteis (PONTES, 2007), sendo encontradas na América do Sul, África e na região da Malásia. (LIMA & PIRANI, 2005). Os gêneros de ocorrência no Brasil são *Tetragastris*, *Crepidospermum*, *Dacryodes* e *Trattinnickia*, sendo *Protium* e *Bursera* os mais representativos (ROCHA & MELO, 2005). Algumas espécies desta família já foram descritas por apresentarem atividades farmacológicas, como antimicrobiana e anti-inflamatória.

Resinas das plantas da família Burseraceae, como *Commiphora incisa*, *Commiphora mukul* e *Boswellia dalzielli*, são utilizadas na medicina popular africana e indiana, principalmente como anti-inflamatório. Estas espécies foram testadas em ratos com edema induzido por carragenina e demonstraram redução significativa do edema acompanhado por inflamação aguda (DUWIEJUA et al, 1993).

Outras plantas da família Burseraceae foram descritas por apresentarem atividade antimicrobiana, como por exemplo, a *Boswellia carteri*, que é uma árvore nativa da Etiópia, Somália, Índia e Península Arábica (BANNO et al, 2006). Sua resina é utilizada pelas medicinas Ayurveda e Chinesa no tratamento da artrite reumatóide e outras doenças inflamatórias. Esta espécie demonstrou atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento dos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (CAMARDA et al, 2007).

Protium é o principal gênero da família Burseraceae de ocorrência na América do Sul, é taxonomicamente e quimicamente muito diverso, abrangendo aproximadamente 140 espécies de árvores tropicais, como por exemplo *Protium heptaphyllum*, *Protium spruceanum*, *Protium decandrum*, *Protium amazonicum*, entre outras. O gênero tem ocorrência em grande extensão do território brasileiro, sendo abundante na bacia amazônica com aproximadamente 35 espécies (FINE et al, 2005).

A espécie *Protium heptaphyllum*, conhecida como almecegueira ou breu-branco-verdadeiro, é utilizada popularmente como anti-inflamatória, expectorante,

analgésica e cicatrizante (BANDEIRA, 2002). Seu extrato bruto foi ativo contra os fungos *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* e também, contra a bactéria gram-positiva *S. aureus* (VIOLANTE et al, 2012).

A espécie *Protium spruceanum* (Benth.) Engler é conhecida popularmente como breu-branco, é encontrado nos domínios da Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica, tendo ocorrência já descrita nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2016). Tem uso na medicina popular para tratar dores de dente, dores de cabeça, dores de estomago e como antipirético (ZOGHBI et al., 2002).

Figura 1 – Frutos, caule e folhas de *Protium spruceanum*



Fonte –

http://ecologia.ib.usp.br/guiaigapo/familias/burseraceae/protium_spruceanum/protium_spruceanum.html

P. spruceanum (Benth.) Engler é uma árvore de copa grande, de aproximadamente 20 m. Caracteriza-se por possuir uma resina incolor, que ao secar se torna um pó branco. Suas folhas possuem de 2 a 3 pares de folíolos, pecíolo semicilíndrico, com tricomas finos, simples, diminutos e eretos, densos a esparsos; pecíolulo delicado cilíndrico, com tricomas simples e eretos, densos a esparsos, pulvínulo inconspícuo; folíolo elíptico e membranáceo; nervura principal proeminente com tricomas finos, densos a esparsos na face inferior; venação broquidódroma. Seu fruto é deiscente e aromático, com um ou mais pirênios uniloculares separados, essencialmente elipsóides, estigma e estilete geralmente persistentes, pericarpo

sublenhoso, liso, brilhante, de amarelo a vermelho quando maduro. Possui raque com 2 a 3 pares de folíolos, elípticos e membranáceos, com margem sempre inteira, nervura principal da face inferior com tricomas finos e eretos, variando de denso a esparso (LIMA et al, 2014) (Figura 1).

O óleo essencial de *P. spruceanum* é composto, em sua maioria, por monoterpenos e sesquiterpenos, havendo predominância de cânfora, epi- α -cadinol, sabineno e limoneno, estes compostos variam de acordo com a época do ano (LIMA et al, 2014; MACHADO et al, 2003; ZOGHBI et al., 2002).

Em 2013, Rodrigues e colaboradores relacionaram os compostos triterpênicos α - e β -amirinas à atividade antiinflamatória do extrato bruto de *P. spruceanum*. Estes compostos triterpênicos são os componentes mais importantes das frações não polares obtidas a partir das resinas de espécies do gênero *Protium*.

Os extratos etanólicos brutos (EEB) de folhas e galhos de *P. spruceanum* já tiveram atividade antimicrobiana relatada e foram considerados de amplo espectro, por apresentar atividade contra 20 espécies de microrganismos diferentes. Os microrganismos mais susceptíveis aos EEBs e frações de *P. spruceanum* foram *S. saprophyticus* e *S. aureus* (AMPARO et al, 2017).

As frações estudadas que apresentaram maior atividade antimicrobiana foram as frações mais polares: acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (HMeOH). Portanto, pode se dizer que o potencial antimicrobiano está relacionado aos metabólitos mais polares dos galhos e folhas, como cumarinas, flavonoides e taninos. Além disso, foi demonstrado que a atividade antimicrobiana dos extratos e frações é maior quanto maior é seu teor de taninos totais (AMPARO, 2016).

A fração que demonstra maior inibição do crescimento de microbiano é a fração AcOEt dos galhos, que possui atividade forte contra *S. aureus*, *S. aureus* MARSA, *S. saprophyticus*, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella enteritidis* e moderada contra *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella oxytoca* (AMPARO, 2016).

3.2 Estudos de antimicrobianos de origem vegetal

Desde a descoberta da penicilina em 1940, houve um grande avanço na saúde com a contenção de doenças infecciosas, porém, o uso incorreto e indiscriminado de antibióticos hoje leva o planeta para uma crise de resistência de microrganismos. O problema da resistência bacteriana está presente tanto nos

países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento, elevando custos da saúde pública com as infecções, no âmbito hospitalar e, também, na comunidade (VON NUSSBAUM et al, 2006).

Há uma necessidade crescente do desenvolvimento de novos antimicrobianos, apesar do desinteresse da indústria farmacêutica na pesquisa desta classe de medicamentos. Essa falta de interesse da indústria deve-se ao fato de que os antibióticos representam um tratamento rápido que gera baixa receita para a indústria quando comparados ao tratamento de doenças crônicas. Portanto, hoje temos um descompasso: enquanto a resistência bacteriana tende aumentar cada vez mais, a descoberta e desenvolvimento de novos antibacterianos estão em declínio (FISCHBACH & WALSH, 2009; VON NUSSBAUM et al, 2006).

Na busca por novos antibacterianos, substâncias produzidas por plantas com atividade antimicrobiana representam uma boa alternativa. Plantas medicinais têm usos relatados pela população brasileira, principalmente rural, contra várias doenças tropicais e infecções dermatológicas fúngicas e bacterianas (DUARTE, 2006).

As plantas produzem um grande número de metabólitos secundários, que participam da defesa contra microrganismos, insetos e herbívoros, além disso, esses compostos conferem pigmento e odor às plantas (TAYLOR, 2013). Dentre estes metabólitos os principais grupos que possuem potencial atividade antimicrobiana são flavonoides, quinonas, cumarinas, taninos, terpenoides e alcaloides (COWAN, 1999).

Os alcaloides possuem atividade antiparasitária, atividade moderada contra micobactérias de crescimento rápido e *Staphylococcus* (TAYLOR, 2013). São compostos heterocíclicos nitrogenados e seu mecanismo de ação antimicrobiano é atribuído à sua capacidade de se intercalar com o DNA bacteriano (COWAN, 1999).

As cumarinas apresentam atividade potente contra bactérias gram-positivas. Seu mecanismo de ação é por meio da inibição da DNA girase bacteriana, enzima que torna a molécula de DNA compacta e biologicamente ativa (TAYLOR, 2013). Com a inibição desta enzima, a molécula de DNA passa a ocupar um grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, provocando a morte das bactérias (ANVISA, 2016).

Os flavonoides e isoflavonoides são compostos fenólicos amplamente distribuídos nas plantas, sua atividade antimicrobiana é baseada na propriedade

desta classe de perturbar a estrutura da membrana dos microrganismos, permitindo a modificação das propriedades de alguns patógenos gram-positivos (TAYLOR, 2013).

Os taninos são substâncias fenólicas poliméricas, seu modo de ação antimicrobiana pode estar relacionado com a sua capacidade de inativar adesinas microbianas, enzimas e proteínas de transporte de envelope celular (COWAN, 1999).

Terpenóides são metabólitos secundários originados do isopreno e constituem o maior grupo de produtos naturais. Alguns membros desta classe de moléculas possuem atividade contra bactérias gram-positivas (TAYLOR, 2013). Seu mecanismo de ação envolve a ruptura da membrana dos microrganismos (COWAN, 1999).

As quinonas são anéis aromáticos com duas substituições cetônicas, seu mecanismo antimicrobiano se dá através da complexação irreversível com aminoácidos em proteínas, muitas vezes levando à inativação da proteína e perda de sua função. Seus alvos prováveis na célula microbiana são adesinas expostas à superfície, polipeptídios de parede celular e enzimas ligadas à membrana (COWAN, 1999).

A monoterapia tem sido a abordagem para a maioria dos compostos antimicrobianos, entretanto, existem evidências crescentes de que as terapias combinadas são mais eficientes do que os tratamentos baseados em um único fármaco. Na pesquisa de compostos fitoterápicos, vários autores destacaram a relevância dos efeitos sinérgicos dos componentes de um extrato bruto (TOMÁS-MENOR et al, 2015). Estes extratos, quando comparados aos compostos ativos isolados são mais eficazes, ou seja, a substância isolada é geralmente menos ativa do que quando se utiliza o extrato bruto. Isto pode ser explicado porque algumas substâncias presentes nas plantas, que são inativas quando isoladas, podem aumentar a atividade dos compostos ativos (GILBERT & ALVES, 2003).

O uso dos ativos isolados quando se compara com a utilização do extrato bruto, pode tornar necessário o aumento da dose da substância ativa, podendo causar toxicidade (GILBERT & ALVES, 2003).

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é geralmente avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM), que é a quantidade mínima necessária para inibir o crescimento de determinado micro-organismo. Não existe

uma padronização de uma metodologia para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de plantas, podem ser utilizadas técnicas de macro ou micro-diluição e difusão em ágar (OSTROSKY et al, 2008).

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo no meio líquido e a concentração da substância estudada, comparado a um padrão de referência. Avalia-se, então, a turbidez provocada pelo crescimento microbiano. A macrodiluição envolve testes em tubos de ensaio, com volume de meio de cultura de 1 a 10 mL, já a microdiluição é feita em microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL (OSTROSKY et al, 2008).

O teste de difusão em ágar é um método físico, no qual um microrganismo é colocado contra uma substância biologicamente ativa em um meio de cultura sólido e, então, se relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo com a atividade da substância estudada. Este método é limitado ao estudo de microrganismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos. O antimicrobiano pode ser testado pelos métodos de difusão por meio de disco, de cilindros de aço inoxidável ou vidro e de perfuração em ágar (OSTROSKY et al, 2008).

3.3 Formulações nanoestruturadas

Formulações nanoestruturadas têm se destacado como formas farmacêuticas mais eficientes para o tratamento de diversas doenças, como dermatites, doenças parasitárias, câncer, entre outras. Estes sistemas são: nanoesferas, nanocápsulas, nanoemulsão, nanopartículas lipídicas sólidas, microemulsões, lipossomas, etossomas e niossomas (GUTERRES et al, 2007).

Os sistemas nanoestruturados possibilitam um tempo de ação mais longo no sítio-alvo, o que evita efeitos adversos provenientes da ação do fármaco em outro local, impede a degradação prematura dos fármacos e diminui a toxicidade (GRIMALDI et al, 2016; SHAO et al, 2016).

3.3.1 Nanoemulsões

Emulsões são formas farmacêuticas que contêm duas fases, uma oleosa e uma aquosa, e geralmente, é um sistema que não tende a se formar sozinho, sendo necessária a aplicação de energia e sua estabilização por agentes tensoativos. Esse sistema pode ser caracterizado como óleo em água (O/A) (Figura 2) ou água em óleo (A/O), onde a primeira fase é a dispersa e a segunda a contínua. As emulsões podem ser classificadas em microemulsões, nanoemulsões e macroemulsões (PEREIRA, 2011).

Os sistemas nanoemulsionados são formados por gotículas entre 20 a 500 nm, são sistemas termodinamicamente estáveis e apresentam transparência e fluidez. As nanoemulsões são bem empregadas como cosméticos e medicamentos de aplicação cutânea, pois apresentam características favoráveis para esse tipo de formulação: tem rápida penetração dos agentes ativos na pele e, sua natureza transparente e fluida, promove um melhor espalhamento e uma sensação agradável à pele (TADROS et al, 2004).

Nanoemulsões vêm ganhando grande destaque na área farmacêutica por sua capacidade de aumentar a eficácia terapêutica de fármacos, permitindo a redução da dose administrada e minimizando os efeitos colaterais potenciais dos fármacos (FORMARIZ et al, 2005).

Sistemas de entrega na escala nanométricas podem potencialmente aumentar os mecanismos de absorção celular passivas, reduzindo as resistências à transferência de massa e aumentando a atividade antimicrobiana (DONSI et al, 2012).



As nanoemulsões têm uma tensão superficial elevada que pode se fundir e, conseqüentemente, romper a membrana de células procariotas, vírus e células eucarióticas de fungos. Um efeito antimicrobiano sinérgico pode ser conferido a alguns surfactantes ou substâncias que possuem atividade antimicrobiana na fórmula para a produção da nanoemulsão (BURANASUKSOMBAT et al, 2011).

As vantagens da utilização de nanoemulsões com antibióticos já foram relatadas em diversos estudos. Um exemplo é a nanoemulsificação A/O da amoxicilina para o tratamento contra a bactéria *Helicobacter pylori*. A emulsificação foi preparada com os surfactantes Span 20 e Tween 20 em várias proporções para a preparação da nanoemulsão de quitosano/heparina para encapsular a amoxicilina, melhorando assim a eficiência do aprisionamento do fármaco e proporcionando uma taxa de liberação mais lenta (LIN et al, 2012).

A liberação das partículas de nanoemulsão do fármaco *in vitro* indicou que o sistema pode controlar a liberação da amoxicilina em um meio simulado de dissolução gastrointestinal. As partículas de nanoemulsão de quitosano/heparina carregadas com amoxicilina podem localizar-se nos espaços intercelulares ou no citoplasma celular, local da infecção por *H. pylori*, e aumentar significativamente a inibição do crescimento da bactéria em comparação com a amoxicilina isolada. Os resultados dos ensaios *in vivo* indicaram que as partículas de nanoemulsão com amoxicilina tinham um efeito de depuração de *H. pylori* mais completo em ratos com infecção induzida por *H. pylori* em relação à amoxicilina não encapsulada (LIN et al, 2012).

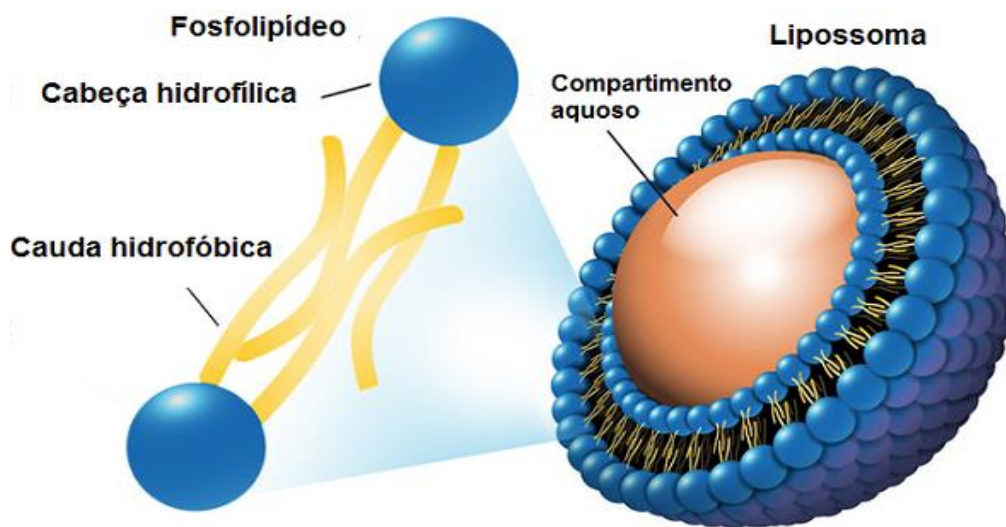
3.3.2 Lipossomas

Lipossomas são estruturas em forma de vesículas formadas por fosfolípidos organizados em uma ou várias bicamadas concêntricas que isolam um compartimento aquoso (GRIMALDI et al, 2016; MACHADO, GNOATT & KLÜPPEL, 2007) (Figura 3).

Os fármacos de interesse carregados pelos lipossomas podem estar contidos, dependendo da característica da substância (hidrofílica ou lipofílica), na camada lipídica ou então, no compartimento aquoso no interior da partícula (LA RICA, AILI & STEVENS, 2012). Os lipossomas possuem um sistema de ação no organismo que disponibiliza apenas uma fração controlada do fármaco ou ativo no tecido-alvo. Suas

vantagens são: utilização de substâncias que têm uso limitado por causa de suas características físico-químicas, potencialização do efeito no sítio de ação, possui maior controle farmacocinético (absorção e distribuição) e redução da toxicidade dos fármacos (MACHADO, GNOATT e KLÜPPEL, 2007). Lipossomas ainda possuem algumas desvantagens, como a má estabilidade coloidal, prazo de validade curto e elevado custo de preparação, devido à natureza dos seus constituintes, os fosfolípidios.

Figura 3 – Estrutura de um lipossoma



Adaptado de <http://www.integratedhealth.com/supplements/liposomes.html>

Vários estudos demonstram que as formulações de lipossomas atingem resultado melhores em termos de distribuição de fármaco e na eficácia terapêutica em relação aos agentes antibacterianos livres (PINTO-ALPHANDARY et al, 2000). A encapsulação de fármacos em lipossomas reduz sua toxicidade e aumenta a eficácia devido à capacidade dos lipossomas se acumularem preferencialmente no local da infecção. Os antibióticos têm sua potência elevada devido à depuração natural dos lipossomas da circulação pelas células fagocíticas, local onde os patógenos intracelulares se localizam (MAURER et al, 1998).

Sistemas de entrega à base de lipossomas resultaram no melhoramento da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum Dictamnus* L., do extrato de *Citrus limon*, dos extratos de *Myrtus* e do óleo essencial de *Artemisia arborescens* L. (DONSI et al, 2012).

3.3.3 Etossomas

Os etossomas são vesículas moles compostas, principalmente, por fosfolípidios, água e etanol (em concentração relativamente alta), podendo ser considerados um subtipo dos lipossomas. São transportadores de fármacos não invasivos que permitem que o ativo penetre nas camadas mais profundas da pele e/ou na circulação sistêmica. A elevada concentração de etanol que esse sistema possui provoca uma desorganização na bicamada lipídica da pele e, também, faz com que a membrana lipídica da vesícula seja embalada de forma menos apertada do que nas vesículas convencionais, permitindo uma estrutura mais maleável que melhora a capacidade de distribuição do fármaco no estrato córneo (VERMA & PATHAK, 2010).

O etanol é um intensificador de permeação e atua interagindo com a cabeça polar das moléculas lipídicas da pele, o que faz com que o ponto de fusão do lipídeo do estrato córneo seja reduzido, aumentando a fluidez lipídica e a permeabilidade da membrana celular. As membranas etossômicas têm alta flexibilidade, isto, somado ao efeito do etanol, permite que as vesículas sejam espremidas entre os poros, que possuem diâmetros menores do que os seus (VERMA & PATHAK, 2012).

Um estudo realizado com nitrato de econazol, antifúngico utilizado no tratamento de infecções cutâneas, demonstrou que os sistemas etossômicos são muito mais eficientes na distribuição de substâncias na pele, tanto em quantidade quanto em profundidade, do que os lipossomas e a solução hidroetanólica do fármaco. Os etossomas provocaram um aumento da permeação percutânea do econazol, melhorando assim sua atividade antifúngica (VERMA & PATHAK, 2012).

Segundo Godin e colaboradores, em 2005, a aplicação dérmica de um etossoma contendo eritromicina em um modelo animal, tem potencial de curar infecções profundas na derme causadas por *S. aureus* semelhante ao tratamento sistêmico com o fármaco.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenvolvimento de nanoformulações

4.1.1 Nanoemulsões O/A

Para o preparo das nanoemulsões O/A foram utilizados os tensoativos hidrofílicos Croduret 50-Special CRODA® e Tween 80 Synth®, e os tensoativos lipofílicos Crill 3 (Pastilles) CRODA® e Span 80 CRODA®. Os óleos utilizados foram Óleo mineral Farmax®, Óleo de milho, Óleo de soja e Óleo de girassol. Para a solubilização da fração foi utilizado o solvente Dimetilsufóxido (DMSO) Synth®. A composição de cada nanoemulsão O/A está descrita no Quadro 1.

Quadro 1- Formulações óleo em água (O/A)

1	Óleo de girassol ----- 10% Crill 3 ----- 5% Croduret 50 ----- 5% Água destilada qsp 10 mL	6	Óleo de girassol ----- 10% Span 80 ----- 3% Tween 80 ----- 7% DMSO ----- 2% Água destilada qsp 20 mL
2	Óleo de girassol ----- 10% Crill 3 ----- 5% Croduret 50 ----- 5% DMSO ----- 2% Água destilada qsp 10 mL	7	Óleo de soja ----- 10% Span 80 ----- 4% Croduret 50 ----- 6% DMSO ----- 2% Água destilada qsp 20 mL
3	Óleo de milho ----- 5% Span 80 ----- 2,5% Tween 80 ----- 7,5% DMSO ----- 2% Água destilada qsp 10 mL	8	Óleo mineral ----- 10% Span 80 ----- 4% Croduret 50 ----- 6% DMSO ----- 2% Água destilada qsp 20 mL
4	Óleo de milho ----- 5% Span 80 ----- 3% Tween 80 ----- 7% DMSO ----- 2% Água destilada qsp 10 mL	9	Óleo mineral ----- 10% Span 80 ----- 3% Tween 80 ----- 7% DMSO ----- 2% Água destilada qsp 20 mL

5	Óleo de milho ----- 10% Span 80 ----- 2,5% Tween 80 ----- 7,5% DMSO ----- 2% Água destilada qsp 20 mL	10	Óleo mineral ----- 10% Crill 3 ----- 3% Tween 80 ----- 7% DMSO ----- 2% Água destilada qsp 20 mL
----------	---	-----------	--

As nanoemulsões foram preparadas pelo método de emulsificação por inversão de fases. A fase oleosa continha o óleo e os tensoativos lipofílico e hidrofílico. A fase aquosa continha água destilada e DMSO. As duas fases foram separadamente aquecidas em um béquer no banho-maria até temperatura de 75 ± 2 °C. Em seguida, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa sob agitação constante a 600 rpm através do agitador mecânico Fisatom 713D. A agitação permaneceu até resfriamento à temperatura ambiente, 25 ± 2 °C. Todas as nanoemulsões foram preparadas primeiramente sem a fração.

Somente a formulação 2, que permaneceu estável por 24 horas, foi preparada com a fração acetato etilênica de *P. spruceanum*. Antes do aquecimento das duas fases, 50 mg da fração foi solubilizada em 200 µL de DMSO, esta solução foi adicionada à água destilada, obtendo-se a fase aquosa. Então, preparou-se a nanoemulsão O/A pelo método de inversão de fases, obtendo uma formulação de concentração igual à 5 mg/mL. A composição da formulação O/A 2 com a fração acetato de *P. spruceanum* está descrita no Quadro 2.

Quadro 2 - Composição da formulação O/A com fração acetato etilênica de galhos de *P. spruceanum*

Formulação O/A (2) com fração acetato etilênica de <i>P. spruceanum</i>	Óleo de girassol ----- 10% Crill 3 ----- 5% Croduret 50 ----- 5% DMSO ----- 2% Fração ----- 0,5% Água destilada qsp 10 mL
---	--

4.1.2 Nanoemulsões A/O

Para o preparo das nanoemulsões A/O foram utilizados o tensoativo lipofílico Span 80 CRODA® e os tensoativos hidrofílicos Croduret 50-Special, Plantarem

2000, Triton X-100 Vetec®, Tween 20 CRODA do Brasil® e Tween 80 Synth®. Os óleos utilizados foram Óleo mineral Farmax® e Óleo de canola. Para a solubilização da fração foi utilizado o solvente DMSO. A composição de cada nanoemulsão A/O está descrita no Quadro 3.

Quadro 3 - Formulações água em óleo (A/O)

1	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 9% Tween 80 ----- 1% Óleo mineral qsp 20 mL	16	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 8,5% Tween 20 ----- 1,5% Óleo mineral qsp 40 mL
2	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 9,5% Tween 80 ----- 0,5% Óleo mineral qsp 20 mL	17	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 8% Tween 20 ----- 2% Óleo mineral qsp 40 mL
3	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 8,5% Tween 80 ----- 1,5% Óleo mineral qsp 20 mL	18	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 7,5% Tween 80 ----- 2,5% Óleo mineral qsp 40 mL
4	Água destilada ----- 20% Span 80 ----- 9% Tween 80 ----- 1% Óleo mineral qsp 20 mL	19	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 7% Triton X ----- 3% Óleo mineral qsp 40 mL
5	Água destilada ----- 20% Span 80 ----- 8% Tween 80 ----- 2% Óleo mineral qsp 20 mL	20	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 7,5% Tween 20 ----- 2,5% Óleo mineral qsp 40 mL
6	Água destilada ----- 20% Span 80 ----- 8% Tween 80 ----- 2% Óleo mineral qsp 40 mL	21	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 7,5% Triton X ----- 2,5% Óleo mineral qsp 40 mL

7	Água destilada ----- 20% Span 80 ----- 7% Tween 80 ----- 3% Óleo mineral qsp 20 mL	22	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 7,5% Triton X ----- 2,5% Óleo mineral qsp 20 mL
8	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 7% Tween 80 ----- 3% Óleo mineral qsp 40 mL	23	Água destilada ----- 20% Span 80 ----- 8% Tween 20 ----- 2% Óleo mineral qsp 20 mL
9	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 2,5% Tween 20 ----- 2,5% Óleo mineral qsp 40 mL	24	Água destilada ----- 20% Span 80 ----- 7,5% Tween 80 ----- 2,5% Óleo mineral qsp 20 mL
10	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 5% Tween 20 ----- 5% Óleo mineral qsp 40 mL	25	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 7% Croduret 50 ----- 3% Óleo mineral qsp 40 mL
11	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 8% Tween 80 ----- 2% Óleo de canola ----- 24% Óleo mineral qsp 40 mL	26	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 7% Plantarem ----- 3% Óleo mineral qsp 40 mL
12	Água destilada ----- 20% Span 80 ----- 7% Tween 80 ----- 3% Óleo de canola ----- 21% Óleo mineral qsp 40 mL	27	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 7,5% Plantarem ----- 2,5% Óleo mineral qsp 40 mL
13	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 9% Triton X ----- 1% Óleo mineral qsp 40 mL	28	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 7% Triton X ----- 3% Óleo de girassol qsp 20 mL

14	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 9% Tween 20 ----- 1% Óleo mineral qsp 40 mL	29	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 7,5% Tween 20 ----- 2,5% Óleo de girassol qsp 20 mL
15	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 8,5% Triton X ----- 1,5% Óleo mineral qsp 40 mL	30	Água destilada ----- 20% Span 80 ----- 14% Triton X ----- 6% Óleo de girassol qsp 20 mL

As nanoemulsões A/O também foram preparadas pelo método de emulsificação por inversão de fases. A fase aquosa continha água destilada e o tensoativo hidrofílico e, a fase oleosa o óleo e o tensoativo lipofílico. As duas fases foram separadamente aquecidas em um béquer no banho-maria até uma temperatura de 75 ± 2 °C. Em seguida, a fase oleosa foi vertida sobre a fase aquosa sob agitação constante a 600 rpm através do agitador mecânico até resfriamento à temperatura 25 ± 2 °C. Todas formulações foram preparadas primeiramente sem a fração.

Posteriormente, a formulação 20, que dentre as formulações estáveis apresentou-se com o melhor tamanho de partícula, foi preparada com a fração acetato etilênica de *P. spruceanum* (Quadro 4). Foi solubilizado 50 mg de fração em 200 µL de DMSO, esta solução foi adicionada em água destilada com o tensoativo hidrofílico, obtendo-se a fase aquosa. As duas fases foram aquecidas, a fase oleosa vertida sobre a fase aquosa e, pelo método de inversão de fases, formou-se a nanoemulsão.

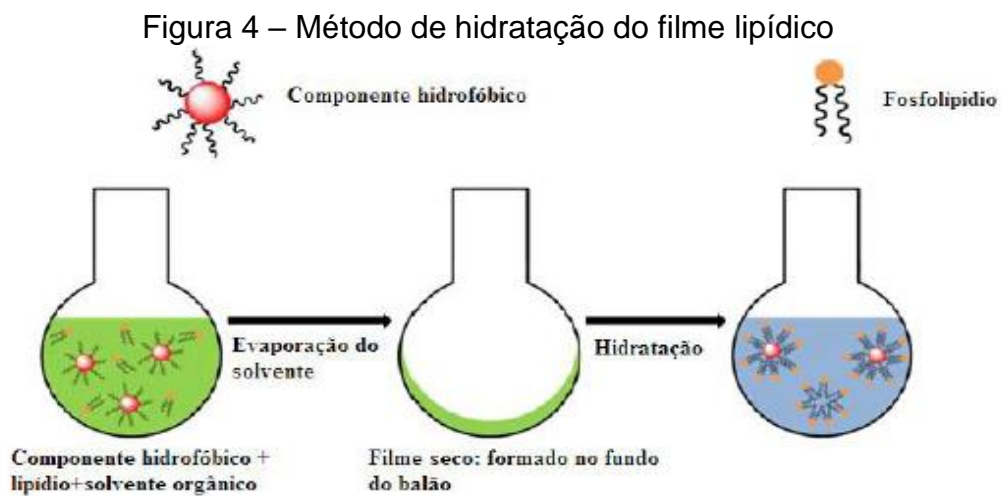
Quadro 4 - Composição da formulação A/O com fração acetato etilênica de galhos de *P. spruceanum*

Formulação A/O (20) com fração acetato etilênica de <i>P. spruceanum</i>	Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 7,5% Tween 20 ----- 2,5% DMSO ---- 2% Fração ----- 0,5% Óleo mineral qsp 10 mL
--	--

4.1.3 Lipossomas e etossomas

Na preparação dos lipossomas e etossomas foram utilizados Colesterol Sigma-Aldrich®, Fosfatidilcolina Sigma-Aldrich®, Phospholipon 80H Lipoid® e Clorofórmio Synth®.

Os lipossomas foram preparados a partir de uma mistura do fosfolípido fosfatidilcolina e colesterol. As etapas de preparação consistiram em: formação, hidratação e dispersão do filme lipídico (Figura 4).



Fonte: Toniazzo, 2013

Foi preparada uma solução de fosfatidilcolina em clorofórmio na concentração de 50mg/mL e uma solução de colesterol em clorofórmio na concentração de 10mg/mL.

Pipetou-se 1 mL da solução de fosfatidilcolina e 1 mL da solução de colesterol para um balão de fundo redondo, que foi levado ao rotavapor até a evaporação completa do solvente. Foi solubilizado 11,2 mg da fração acetato etilênica de *P. spruceanum* em 100 μ L de DMSO e, depois, adicionou-se 4900 μ L de água ultrapurificada. Esta solução aquosa, então, foi utilizada para hidratar o filme lipídico formado no balão. A hidratação foi realizada à temperatura de 40 °C no ultrassom (UltraCleaner 1600, Unique®). A composição do lipossoma está descrita no Quadro 5.

Após a formação do lipossoma, foi realizada a diminuição de partículas utilizando o ultrassom e o Ultraturrax IKA® T25 com velocidade de 15000 rpm à 50 °C durante uma hora.

Quadro 5 - Composição do lipossoma

1	Fosfatidilcolina ----- 1% Colesterol ----- 0,2% Fração ----- 0,224% DMSO ----- 2% Água qsp 5 mL
---	---

Os etossomas foram preparados por dois métodos diferentes. Primeiro pelo método de hidratação do filme lipídico. Foram adicionados em um balão de fundo redondo 2 mL da solução de fosfatidilcolina em clorofórmio 50mg/mL e levado ao rotavapor até a evaporação completa do solvente. Foi solubilizado 12,5 mg da fração acetato etilênica em 1,5 mL de etanol e adicionado 3,5 mL de água ultrapurificada, com esta solução aquosa, então, hidratou-se o filme lipídico à temperatura ambiente. Após a formação do etossoma, foi realizada a diminuição de partículas utilizando o ultrassom e o Ultraturrax® com velocidade de 15000 rpm à 25°C durante uma hora.

Pelo outro método, denominado Método a Frio (VERMA & PATHAK, 2012), a Fosfatidilcolina ou Phospholipon 80H e a fração acetato etilênica foram solubilizados em etanol, posteriormente, adicionou-se água ultrapurificada em pequenas quantidades sob agitação mecânica a 700 rpm por cinco minutos à 25 °C. Após a formação do etossoma, foi realizada a diminuição de partículas utilizando o ultrassom (UltraCleaner 1600, Unique®) e o Ultraturrax IKA® T25 com velocidade de 15000 rpm à 25 °C durante uma hora. A composição de cada etossoma está descrita no Quadro 6.

Quadro 6 – Etossomas

	Formulação	Método
1	Fosfatidilcolina ----- 2% Etanol ----- 30% Fração ----- 0,25% Água qsp 5 mL	Formação do filme lipídico

2	Fosfatidilcolina ----- 1% Colesterol ----- 0,2% Etanol ----- 30% Fração ----- 0,225% Água qsp 5 mL	Formação do filme lipídico
3	Fosfatidilcolina ----- 3% Etanol ----- 40% Fração ----- 0,225% Água qsp 5 mL	Formação do filme lipídico
4	Phospholipon 80H ----- 2% Etanol ----- 20% Fração ----- 0,225% Água qsp 5 mL	Método a frio
5	Phospholipon 80H ----- 2% Etanol ----- 30% Fração ----- 0,225% Água qsp 5 mL	Método a frio
6	Phospholipon 80H ----- 2% Etanol ----- 40% Fração ----- 0,225% Água qsp 5 mL	Método a frio
7	Phospholipon 80H ----- 1% Etanol ----- 20% Fração ----- 0,225% Água qsp 5 mL	Método a frio
8	Phospholipon 80H ----- 1% Etanol ----- 30% Fração ----- 0,225% Água qsp 5 mL	Método a frio
9	Phospholipon 80H ----- 1% Etanol ----- 40% Fração ----- 0,225% Água qsp 5 mL	Método a frio

4.2 Caracterização das formulações

As formulações foram analisadas macroscopicamente após 24h da sua produção, as formulações que não apresentaram indicativo de instabilidade (separação de fases ou precipitação) foram caracterizadas pela determinação do valor de tamanho de partículas e pelo índice de polidispersão das partículas (IPD), utilizando o aparelho ZetaSizer®.

As medições de tamanho feitas pelo ZetaSizer® são realizadas pela espectroscopia de correlação de fótons ou espalhamento dinâmico da luz (DLS), que se baseia nos princípios de espalhamento da luz e no movimento Browniano. É amplamente utilizado para avaliar as dimensões das partículas em suspensão. A solução é colocada em uma cubeta de quartzo e, dentro do equipamento, as partículas são iluminadas com um laser e, então, espalham a radiação, sendo que a intensidade da luz espalhada depende do tamanho das partículas. Devido ao movimento Browniano das partículas, há flutuações de intensidade de luz espalhada. Estas flutuações são correlacionadas com o tamanho da partícula, sendo que o movimento Browniano é inversamente proporcional ao diâmetro da partícula e depende da temperatura e viscosidade do meio.

Para indicar a estabilidade das formulações, foram realizadas medidas de tamanho e IPD após a preparação das formulações que continham a fração nos intervalos de tempo: 24 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias.

Os resultados de medida de tamanho foram analisados através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 5. As diferenças foram consideradas significantes quando valor de p foi menor que 0,05.

4.3 Atividade antimicrobiana

As nanoformulações com a fração foram avaliadas em ensaios de sensibilidade pelo método de microdiluição em caldo, seguindo as recomendações da *Clinical and laboratory standards institute* (CLSI, 2012). Os testes foram realizados em caldo Mueller-Hinton contido em microplacas de 96 poços, utilizando *S. saprophyticus*, que é o microrganismo mais sensível ao extrato AcOEt de galhos de *P. spruceanum* (AMPARO et al, 2017).

No poço 1A da placa de 96 poços, foi colocado 78,0 µL da formulação 2 O/A e nos poços de B até H da fileira 1 foi colocado 39 µL de caldo Mueller-Hinton. Então, realizou-se uma diluição em série até o poço H, sempre utilizando o fator de diluição 1:2. Pipetou-se 39 µL do poço A para o poço B e assim sucessivamente até o poço H. Obtendo-se a concentração da fração igual à 3,05 mg/mL.

Desta forma se obteve, seguindo a técnica de diluição em série, 8 diferentes concentrações: 3,05 mg/mL, 1,525 mg/mL, 0,7625 mg/mL, 0,3813 mg/mL, 0,1906 mg/mL, 0,0953 mg/mL, 0,0477 mg/mL e 0,0238 mg/mL.

O mesmo procedimento foi realizado para na fileira 2 da placa de 96 poços para a formulação 20 A/O.

Também foram depositados na placa de 96 poços os controles das formulações sem a fração acetato etilênica, do caldo Mueller-Hinton, dos microrganismos e do antibiótico padrão (tetraciclina) e fração com DMSO nas mesmas concentrações das formulações.

O inóculo foi preparado com o microrganismo *S. saprophyticus* ATCC 15305, a partir da solução 1×10^8 UFC/mL, segundo a escala de McFarland. Então, o inóculo foi diluído para que a concentração final nos poços fosse de 5×10^5 UFC/mL. Pipetou-se 25 µL de inóculo em cada poço contendo as diluições da formulação e nos controles positivo (antibiótico padrão) e negativo (formulação sem a fração).

A placa foi incubada a 37 °C por 24 h. Após a incubação, colocou-se em todos os poços da placa 20 µL da solução reveladora cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) Neon® na concentração de 0,5 mg/mL. Então, a placa foi novamente incubada por 3 horas e depois analisado o aparecimento de coloração rosa nos poços, indicando a presença de crescimento microbiano e foi feito o repique dos poços em que havia interferência da coloração da fração para avaliar o crescimento dos microrganismos.

4.4 Ensaio de liberação

4.4.1 Quantificação de fenólicos totais

Para se elaborar a curva padrão de ácido gálico, foi preparada uma solução estoque de ácido gálico com concentração de 1 mg/mL. Desta solução estoque foram preparadas diluições de 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 e 150,0 µg/mL.

Para avaliar a sensibilidade do método de quantificação, foi feita uma curva da fração acetato etilênica. Preparou-se uma solução estoque com concentração de 2 mg/mL de etanol. Desta solução estoque foram preparadas diluições de 0,0976; 0,1953; 0,3906; 0,7813; 1,5625; 3,125; 6,25 µg/mL.

Para a quantificação dos fenólicos presentes na fração liberados no ensaio de diálise, foram recolhidas alíquotas de 1 mL do meio receptor, no intervalo de 48 horas.

Todas as diluições de ácido gálico, fração e as alíquotas recolhidas do ensaio de liberação por diálise foram pipetadas 20 µL para placa de 96 poços, adicionou-se 90 µL de água ultrapurificada e 10 µL de Solução Folin-Ciocalteu reativo Cromoline® em cada poço, agitou-se por um minuto e se adicionou 40 µL de carbonato de cálcio (Na₂CO₃) 15% (p/v), então, agitou-se durante 30 segundos e se adicionou 40 µL de água ultrapurificada. As placas foram incubadas por 2 horas, e posteriormente, foi realizada a leitura da absorbância das amostras em leitor de 96 poços a 650 nm. Também foram retirados 20 µL das diluições de ácido gálico e fração e das alíquotas recolhidas do meio receptor e adicionados 180 µL de água ultrapurificada para se quantificar o branco.

4.4.2 Determinação das condições sink (solubilidade)

Para o teste de solubilidade da fração, foi dissolvido 5,0, 2,5 e 1,25 mg da fração acetato etilênica em 10 mL de caldo Mueller-Hinton. Estas misturas foram colocadas no ultrassom durante uma hora e não solubilizaram, apresentando precipitados.

Então, foi preparada uma solução com 10% de DMSO, 30% de etanol e 60% de tampão PBS. Nesta solução tampão foi solubilizado 5,0 mg de fração em 1 mL de meio tampão. Para comparação, também foi preparada uma solução a 5 mg/mL de fração em etanol, solvente que garante a total solubilização dos componentes da fração.

Para quantificar o a porcentagem de fração foi solubilizada na solução tampão, foi determinado o teor de fenólicos totais da solução 5 mg/mL de fração em etanol e da solução 5 mg/mL da frção em meio tampão pelo método de Folin-Ciocalteu descrito no item 4.4.1.

Os resultados de fenólicos totais foram analisados através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 5. As diferenças foram consideradas significantes quando valor de P foi menor que 0,05.

4.4.3 Teste de liberação por diálise

Realizou-se o ensaio de liberação para as formulações 20 A/O e 2 O/A, em triplicata. Foi colocado 1 mL de formulação em um saco de diálise, constituído por membrana sintética de diálise de celulose (Dialysis tubing cellulose membrane D9777- 100FT, 25x16 mm - Sigma-Aldrich®), esta membrana foi colocada em um béquer com o auxílio de um bastão de vidro. Este béquer continha 200 mL de meio receptor (solução 10% de DMSO, 30% de etanol e 60% de tampão PBS).

A diálise foi realizada à 37 °C e com agitação horizontal. Alíquotas de 1 mL do meio receptor de cada triplicata foram retiradas nos tempos de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24 e 48 horas, sendo o volume retirado do meio substituído por igual quantidade de solução receptora, o que manteve o sistema nas mesmas condições de trabalho.

Ao final das 48 horas, para determinar a quantidade de fração liberada pela formulação foi quantificado o teor total de fenólicos no meio receptor, pelo método de Folin-Ciocalteu descrito no item 4.4.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento das nanoformulações

5.1.1 Nanoemulsões

As nanoemulsões vêm sendo estudadas desde a década de 1980, mostrando-se uma alternativa para a administração de fármacos. Essas formulações, em relação às emulsões comuns, apresentam vantagens como possuir maior estabilidade física a longo prazo e utilizar menor concentração de tensoativos do que as micro e macroemulsões (LIU et al, 2006).

As formulações do presente estudo foram desenvolvidas pelo método de inversão de fases. Esse princípio é baseado na mudança na curvatura espontânea dos surfactantes durante o processo de emulsão, o que é conseguido quando se altera a temperatura das fases (LIU et al, 2006).

Em toda emulsão deve estar presente um agente emulsionante ou uma combinação de emulsionantes, onde a relação entre a cabeça hidrofílica e a cauda lipofílica da molécula seja ideal para formar uma emulsão específica. É neste conceito que se baseia o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) (CHEN & TAO, 2004). O sistema EHL é uma escala arbitrária proposta por Griff em 1949, na qual os valores variam entre 0 e 20, sendo possível se estabelecer um valor de EHL para determinado tensoativo ou para uma mistura de tensoativos (FLORENCE & ATTWOOD, 2011). Sabe-se que um agente emulsionante com EHL inferior a 7 favorece a formação de emulsões A/O, enquanto emulsionantes com valor de EHL maior que 7 favorece emulsões O/A (CARPENTER & SAHARAN, 2016).

As emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis. Para se calcular a concentração relativa de tensoativos necessários para produzir uma emulsão estável para misturas de óleo e água, utiliza-se o EHL. O EHL obtido para um óleo determinado corresponde à emulsão ideal para este óleo (LEAL et al, 2013). As nanoemulsões foram preparadas variando a porcentagem dos tensoativos hidrofílicos e lipofílicos, mantendo a proporção de 10% de tensoativo em cada formulação, como descrito nos quadros 7 e 8. Segundo Leal e colaboradores, em 2013, as nanoemulsões com porcentagem de tensoativos de 10% a 15%, são as

formulações que apresentam maior estabilidade, avaliando-se o tamanho médio e da distribuição de gotículas.


As proporções entre os tensoativos foram ajustadas para o EHL de interesse, de acordo com o tipo de emulsão desejada: A/O ou O/A. A variação na quantidade de surfactante foi proposta seguindo a seguinte equação:




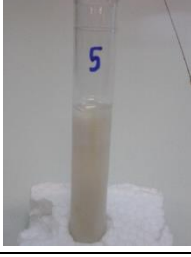



$$EHL_{emulsão} = (EHL_L \times L\%) + (EHL_H \times H\%)$$


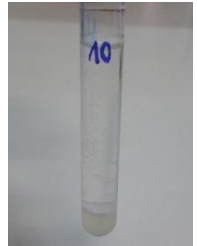
Onde $EHL_{emulsão}$ é igual ao EHL desejado para a nanoemulsão, o EHL_L é o valor de EHL para o tensoativo lipofílico, o EHL_H é o valor de EHL do tensoativo hidrofílico e os valores L% e H% são as porcentagens de cada tensoativo usada na formulação.

A maior parte das nanoemulsões O/A apresentaram separação de fases, o que indica instabilidade (Quadro 7). Segundo Khan e colaboradores, 2011, a instabilidade de uma emulsão pode ocorrer quando sua estrutura é alterada pelos fenômenos de coalescência, cremação, floculação e separação de fases. A cremação ocorre quando as fases se separam formando uma camada superior. Já a floculação é a associação de pequenas partículas da emulsão que tende a formar um agregado, que geralmente é redispersável após a agitação. A coalescência se dá quando as gotículas se unem, formando gotículas progressivamente maiores. A separação ocorre quando um grande número de partículas coalesce, levando a formação de duas fases.

Quadro 7 - Formulações O/A desenvolvidas e suas respectivas características macroscópicas após 24h da preparação

		Formulação	EHL	Característica
1		Óleo de girassol ----- 10% Crill 3 ----- 5% Croduct 50 ----- 5% Água destilada qsp 10 mL	9,4	Estável



2		Óleo de girassol ----- 10% Crill 3 ----- 5% Croduret 50 ----- 5% DMSO ----- 2% Água destilada qsp 10 mL	9,4	Estável
3		Óleo de milho ----- 5% Span 80 ----- 2,5% Tween 80 ----- 2,5% DMSO ----- 2% Água destilada qsp 10 mL	12,3	Separou em duas fases
4		Óleo de milho ----- 5% Span 80 ----- 3% Tween 80 ----- 7% DMSO ----- 2% Água destilada qsp 10 mL	11,7	Separou em duas fases
5		Óleo de milho ----- 10% Span 80 ----- 2,5% Tween 80 ----- 7,5% DMSO ----- 2% Água destilada qsp 20 mL	12,35	Separou em duas fases
6		Óleo de girassol ----- 10% Span 80 ----- 3% Tween 80 ----- 7% DMSO ----- 2% Água destilada qsp 20 mL	11,79	Separou em duas fases
7		Óleo de soja ----- 10% Span 80 ----- 4% Croduret 50 ----- 6% DMSO ----- 2% Água destilada qsp 20 mL	10,18	Separou em duas fases
8		Óleo mineral ----- 10% Span 80 ----- 4% Croduret 50 ----- 6% DMSO ----- 2% Água destilada qsp 20 mL	10,18	Separou em duas fases




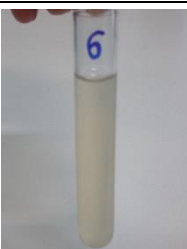

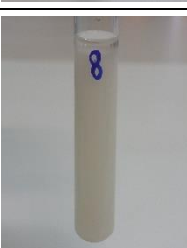

9		Óleo mineral ----- 10% Span 80 ----- 3% Tween 80 ----- 7% DMSO ----- 2% Água destilada qsp 20 mL	11,79	Separou em duas fases
10		Óleo mineral ----- 10% Crill 3 ----- 3% Tween 80 ----- 7% DMSO ----- 2% Água destilada qsp 20 mL	11,91	Separou em duas fases

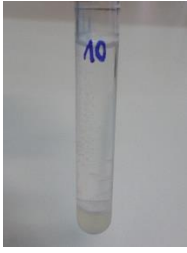






A formulação escolhida para a incorporação da fração acetato etilênica de *P. spruceanum* foi a O/A 2, já que foi a única formulação estável na presença de DMSO, que é o solvente necessário para a solubilização da fração.






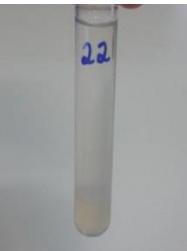

Já as nanoemulsões A/O, apenas as formulações 18, 19, 20 e 25 foram estáveis (translúcidas) após 24 horas da preparação, sem apresentarem sinais de instabilidade (Quadro 8). Então, o tamanho e o índice de polidispersão (IPD) destas formulações foram determinados e os resultados apresentados na Tabela 1.

Quadro 8 - Formulações A/O desenvolvidas e suas respectivas características macroscópicas após 24h da preparação

		Formulação	EHL	Características
1		Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 9% Tween 80 ----- 1% Óleo mineral qsp 20 mL	5,37	Separou em duas fases
2		Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 9,5% Tween 80 ----- 0,5% Óleo mineral qsp 20 mL	4,835	Separou em duas fases

3		<p>Água destilada ----- 10%</p> <p>Span 80 ----- 8,5%</p> <p>Tween 80 ----- 1,5%</p> <p>Óleo mineral qsp 20 mL</p>	5,905	Separou em duas fases
4		<p>Água destilada ----- 20%</p> <p>Span 80 ----- 9%</p> <p>Tween 80 ----- 1%</p> <p>Óleo mineral qsp 20 mL</p>	5,37	Separou em duas fases
5		<p>Água destilada ----- 20%</p> <p>Span 80 ----- 8%</p> <p>Tween 80 ----- 2%</p> <p>Óleo mineral qsp 20 mL</p>	6,44	Separou em duas fases
6		<p>Água destilada ----- 20%</p> <p>Span 80 ----- 8%</p> <p>Tween 80 ----- 2%</p> <p>Óleo mineral qsp 40 mL</p>	6,44	Formou precipitado
7		<p>Água destilada ----- 20%</p> <p>Span 80 ----- 7%</p> <p>Tween 80 ----- 3%</p> <p>Óleo mineral qsp 20 mL</p>	7,51	Separou em três fases
8		<p>Água destilada ----- 10%</p> <p>Span 80 ----- 7%</p> <p>Tween 80 ----- 3%</p> <p>Óleo mineral qsp 40 mL</p>	7,51	Separou em duas fases
9		<p>Água destilada ----- 10%</p> <p>Span 80 ----- 2,5%</p> <p>Tween 20 ----- 2,5%</p> <p>Óleo mineral qsp 40 mL</p>	10,5	Separou em três fases

10		<p>Água destilada ----- 10%</p> <p>Span 80 ----- 5%</p> <p>Tween 20 ----- 5%</p> <p>Óleo mineral qsp 40 mL</p>	10,5	Separou em duas fases
11		<p>Água destilada ----- 10%</p> <p>Span 80 ----- 8%</p> <p>Tween 80 ----- 2%</p> <p>Óleo de canola ----- 24%</p> <p>Óleo mineral qsp 40 mL</p>	6,44	Separou em duas fases
12		<p>Água destilada ----- 20%</p> <p>Span 80 ----- 7%</p> <p>Tween 80 ----- 3%</p> <p>Óleo de canola ----- 21%</p> <p>Óleo mineral qsp 40 mL</p>	7,51	Separou em duas fases
13		<p>Água destilada ----- 10%</p> <p>Span 80 ----- 9%</p> <p>Triton X ----- 1%</p> <p>Óleo mineral qsp 40 mL</p>	5,22	Separou em duas fases
14		<p>Água destilada ----- 10%</p> <p>Span 80 ----- 9%</p> <p>Tween 20 ----- 1%</p> <p>Óleo mineral qsp 40 mL</p>	5,54	Separou em duas fases
15		<p>Água destilada ----- 10%</p> <p>Span 80 ----- 8,5%</p> <p>Triton X ----- 1,5%</p> <p>Óleo mineral qsp 40 mL</p>	5,68	Separou em duas fases
16		<p>Água destilada ----- 10%</p> <p>Span 80 ----- 8,5%</p> <p>Tween 20 ----- 1,5%</p> <p>Óleo mineral qsp 40 mL</p>	6,16	Separou em duas fases

17		<p>Água destilada ----- 10%</p> <p>Span 80 ----- 8%</p> <p>Tween 20 ----- 2%</p> <p>Óleo mineral qsp 40 mL</p>	6,78	Separou em duas fases
18		<p>Água destilada ----- 10%</p> <p>Span 80 ----- 7,5%</p> <p>Tween 80 ----- 2,5%</p> <p>Óleo mineral qsp 40 mL</p>	6,975	Estável
19		<p>Água destilada ----- 10%</p> <p>Span 80 ----- 7%</p> <p>Triton X ----- 3%</p> <p>Óleo mineral qsp 40 mL</p>	7,06	Estável
20		<p>Água destilada ----- 10%</p> <p>Span 80 ----- 7,5%</p> <p>Tween 20 ----- 2,5%</p> <p>Óleo mineral qsp 40 mL</p>	7,4	Estável
21		<p>Água destilada ----- 10%</p> <p>Span 80 ----- 7,5%</p> <p>Triton X ----- 2,5%</p> <p>Óleo mineral qsp 40 mL</p>	6,6	Separou em duas fases
22		<p>Água destilada ----- 10%</p> <p>Span 80 ----- 7,5%</p> <p>Triton X ----- 2,5%</p> <p>Óleo mineral qsp 20 mL</p>	6,6	Separou em duas fases
23		<p>Água destilada ----- 20%</p> <p>Span 80 ----- 8%</p> <p>Tween 20 ----- 2%</p> <p>Óleo mineral qsp 20 mL</p>	6,78	Separou em duas fases








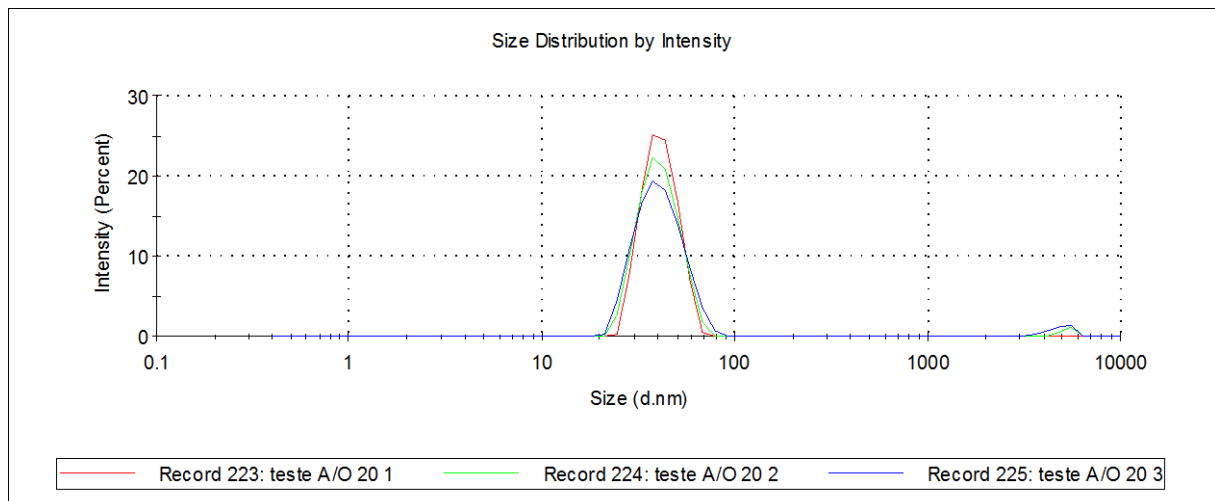
24		Água destilada ----- 20% Span 80 ----- 7,5% Tween 80 ----- 2,5% Óleo mineral qsp 20 mL	6,975	Separou em duas fases
25		Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 7% Croduret 50 ----- 3% Óleo mineral qsp 40 mL	7,24	Estável
26		Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 7% Plantarem ----- 3% Óleo mineral qsp 40 mL	6,91	Separou em duas fases
27		Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 7,5% Plantarem ----- 2,5% Óleo mineral qsp 40 mL	6,47	Formou precipitado
28		Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 7% Triton X ----- 3% Óleo de girassol qsp 20 mL	7,06	Separou em duas fases
29		Água destilada ----- 10% Span 80 ----- 7,5% Tween 20 ----- 2,5% Óleo de girassol qsp 20 mL	7,4	Separou em duas fases
30		Água destilada ----- 20% Span 80 ----- 14% Triton X ----- 6% Óleo de girassol qsp 20 mL	7,06	Separou em duas fases

Tabela 1 - Medida de tamanho e polidispersão (IPD) das partículas das formulações A/O estáveis após 24 horas de preparação

Formulação	Tamanho (nm)	IPD
18	36,5 ± 0,4277	0,442 ± 0,056
19	129,2 ± 10,21	0,672 ± 0,066
20	40,63 ± 0,4934	0,148 ± 0,119
25	50,46 ± 0,9166	0,129 ± 0,036

A escolha da formulação A/O para a incorporação da fração acetato etilênica de *P. spruceanum* foi feita de acordo com o tamanho e IPD das partículas (Tabela 1). O IPD é um índice que avalia a variação de tamanho das partículas dispersas na formulação (AFFANDI et al, 2011), o ideal é que o valor de IPD esteja o mais perto de 0,1, o que é indicativo de um sistema monodisperso e, quanto maior o IPD, maior a distribuição do tamanho de gotículas (MIKULCOVÁ et al, 2017). Avaliando-se estes parâmetros, a que melhor se apresentou foi a formulação 20 (Tabela 1 e Figura 5), que então foi escolhida para incorporação da fração.

Figura 5 - Gráfico da formulação 20 A/O de distribuição de tamanho por intensidade



5.1.2 Lipossomas e etossomas

Para a preparação do lipossoma foi utilizada a técnica de dispersão do filme lipídico. Apesar de ser um método de simples execução, os lipossomas formados

por hidratação do filme lipídico tem uma distribuição de tamanho de partículas bastante heterogenea (TONIAZZO, 2013).

Os etossomas foram preparados pelos métodos de dispersão do filme lipídico e a frio. O método à frio é o mais comumente utilizado para a preparação de etossomas (VERMA & PATHAK, 2010). As formulações foram preparadas variando-se a concentração de etanol na formulação.

Os lipossomas e etossomas preparados não incorporaram por completo a fração de *P. spruceanum*, apresentando formação de precipitados após sua produção (Quadro 9). Portanto, não foram realizados testes de caracterização e de atividade antimicrobiana com estas formulações.

Quadro 9 - Etossomas desenvolvidos e suas características após 24h da preparação

	Formulação	Método	Características
1	Fosfatidilcolina ----- 2% Etanol ----- 30% Fração ----- 0,25% Água qsp 5 mL	Formação do filme lipídico	Precipitou
2	Fosfatidilcolina ----- 1% Colesterol ----- 0,2% Etanol ----- 30% Fração ----- 0,225% Água qsp 5 mL	Formação do filme lipídico	Precipitou
3	Fosfatidilcolina ----- 3% Etanol ----- 40% Fração ----- 0,225% Água qsp 5 mL	Formação do filme lipídico	Precipitou
4	Phospholipon 80H ----- 2% Etanol ----- 20% Fração ----- 0,225% Água qsp 5 mL	Método a frio	Precipitou
5	Phospholipon 80H ----- 2% Etanol ----- 30% Fração ----- 0,225% Água qsp 5 mL	Método a frio	Precipitou

6	Phospholipon 80H ----- 2% Etanol ----- 40% Fração ----- 0,225% Água qsp 5 mL	Método a frio	Precipitou
7	Phospholipon 80H ----- 1% Etanol ----- 20% Fração ----- 0,225% Água qsp 5 mL	Método a frio	Precipitou
8	Phospholipon 80H ----- 1% Etanol ----- 30% Fração ----- 0,225% Água qsp 5 mL	Método a frio	Precipitou
9	Phospholipon 80H ----- 1% Etanol ----- 40% Fração ----- 0,225% Água qsp 5 mL	Método a frio	Precipitou

Pode haver alguma incompatibilidade da fração com componentes da formulação, já que não houve incorporação completa da fração e instabilidade das formulações. Estudos complementares devem ser realizados com outras proporções entre fração e fosfolipídeos.

5.2 Caracterização das formulações

As formulações estáveis, que continham a fração acetato etilênica, foram caracterizadas quanto ao tamanho das gotículas e pelo índice de polidispersão (IPD) nos tempos de 1, 7, 14, 21 e 28 dias após o preparo da nanoemulsão (Tabela 1). Mudanças nas medidas de tamanho de partícula e IPD indicam que os fenômenos de coalescência e floculação estão acontecendo, levando à instabilidade da formulação (AFFANDI et al, 2011). Sendo assim, indica-se que a formulação O/A se manteve estável durante os 28 dias testados, já a formulação A/O apresentou instabilidade a partir da medida do 14º dia, apresentando um tamanho de partícula muito elevado e presença de precipitados, portanto, não se procederam as próximas leituras.

Sabe-se que o IPD é uma estimativa da faixa de distribuição de gotículas na formulação. Os valores de IPD de aproximadamente 0,1 correspondem à

polidispersão de sistemas monodispersos e valores maiores que 0,7 indicam que a amostra possui uma distribuição de tamanho muito ampla (MIKULCOVÁ et al, 2017), as nanoemulsões caracterizadas apresentaram valor de IPD foram satisfatórios (Tabela 2), indicando uma faixa pequena de distribuição de partículas.

Tabela 2 - Medida do tamanho (nm) e do índice de polidispersão das partículas (IPD) durante 28 dias

	Medida	1 dia	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
2	Tamanho	81,58 ±	81,29 ±	82,36 ± 0,94	81,24 ± 0,69	82,7 ± 1,485
	(nm)	0,302	0,095			
(O/A)	IPD	0,124 ±	0,129 ±	0,126 ±	0,139 ±	0,122 ±
		0,012	0,008	0,013	0,006	0,006
20	Tamanho	180,8 ±15,3	192,2 ±	7292 ± 262,9	----	----
	(nm)		0,735			
(A/O)	IPD	0,263 ±	0,27 ± 0,035	0,304 ±	----	----
		0,063		0,029		

As principais características de uma nanoemulsão são o tamanho e a distribuição das partículas, estes parâmetros são indicativos da estabilidade da formulação (MIKULCOVÁ et al, 2017). Segundo Leal et al, 2013, para se considerar uma emulsão estável, esta deve manter os compostos de fase oleosa na fase de dispersão, ou vice-versa, depois de sofrerem tensões causadas por variações de temperatura, agitação e gravidade. Desta forma, como as nanoemulsões foram caracterizadas apenas por tamanho e polidispersão das partículas, temos somente um indicativo da estabilidade destas formulações.

Na Tabela 2 é possível observar as mudanças de tamanho em função do tempo de armazenamento das formulações. A formulação O/A não apresentou variação estatística ($p < 0,05$) ao longo dos 28 dias (Tabela 2 e Figura 6), enquanto na formulação A/O se observa um aumento no tamanho das gotículas significativo entre 7 e 14 dias (Tabela 2 e Figura 7), ou seja, a formulação se torna instável ao longo do tempo de armazenamento. Segundo Liu et al, 2006, as emulsões em sistemas não equilibrados tendem a reduzir suas áreas interfaciais através de processo de degradação, cremação, floculação e coalescência.

Figura 6 - Gráfico da distribuição de tamanho por intensidade da nanoformulação O/A 2 nos 1 (a), 7 (b), 14 (c), 21 (d) e 28 (e) dias após sua preparação

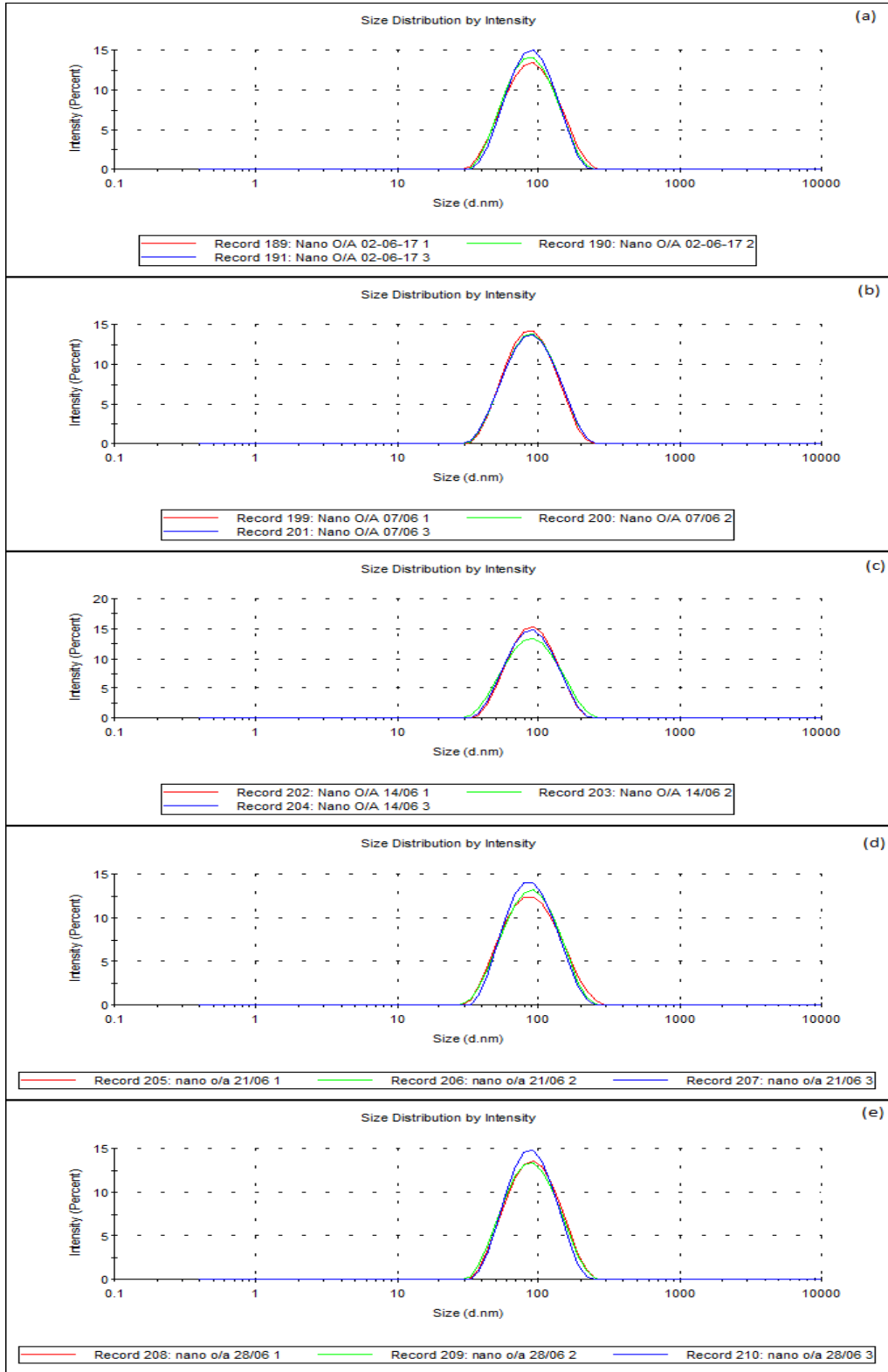
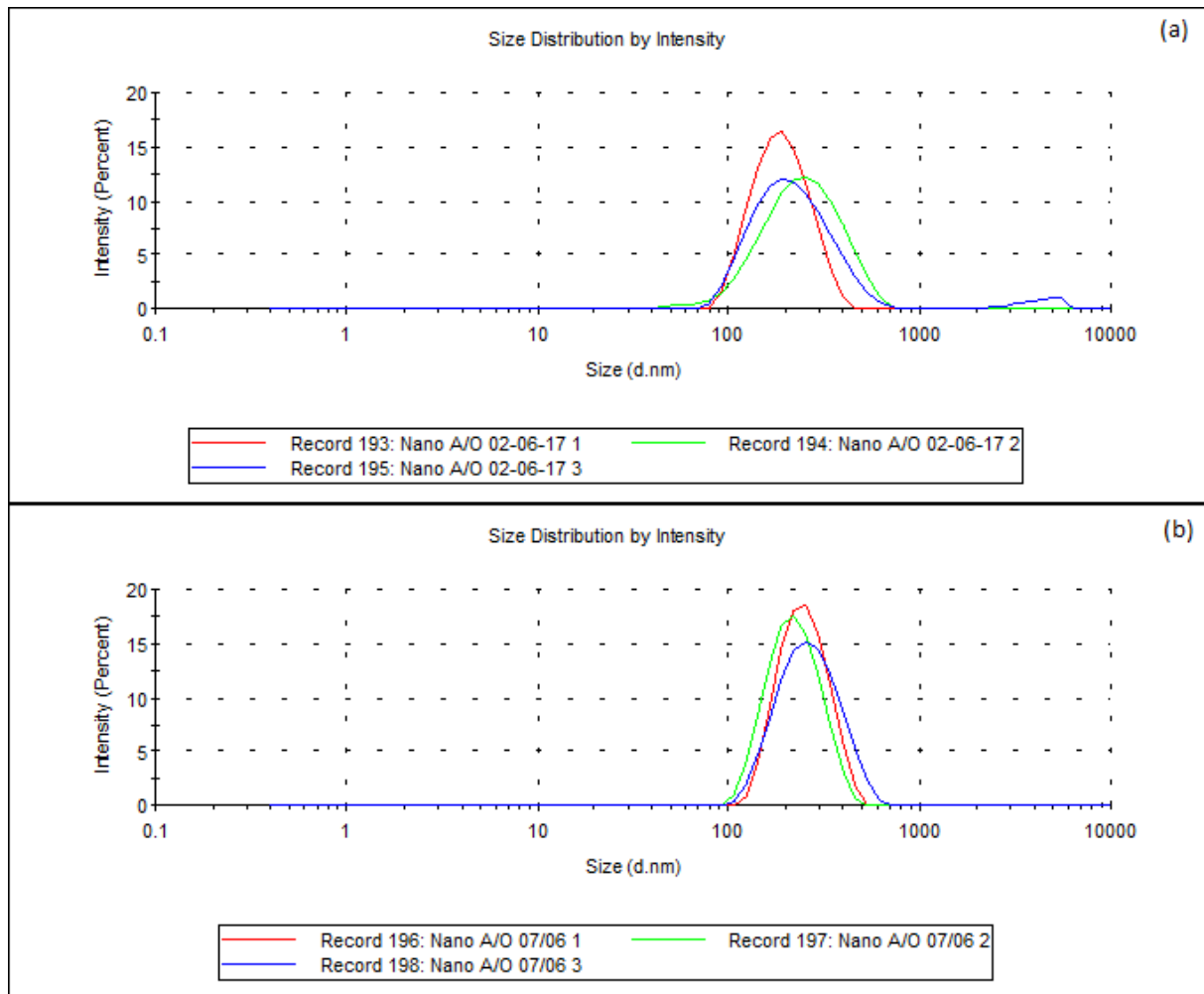


Figura 7 - Gráfico de distribuição de tamanho de partícula por intensidade da formulação A/O 20 nos 1 (a) e 7 (b) dias após sua preparação



5.3 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das formulações que demonstraram estabilidade após 24 horas foi testada por meio da técnica de microdiluição em caldo.

Esse método avalia a atividade de extratos vegetais através da determinação da menor quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste. Esse valor é conhecido como concentração inibitória mínima (CIM) (OSTROSKY et al, 2008).

Para a indicação do crescimento de microrganismos na placa foi utilizado como indicador uma solução de CTT. Os sais de tetrazólio são freqüentemente utilizados para indicar atividade biológica porque o composto incolor atua como um

acceptor de elétrons e é reduzido a um produto colorido por organismos biologicamente ativos (ELOFF, 1998).

Houve crescimento microbiano em todos os poços contendo as diluições das formulações, tanto A/O quanto O/A, demonstrado pela presença de cor.

No teste apenas com a fração com DMSO a CIM foi de 0,7625 mg/mL.

No poço contendo o controle positivo (tetraciclina e inóculo) não houve crescimento microbiano. No controle negativo, onde utilizou-se as formulações A/O e O/A sem a fração, houve crescimento de bactéria, portanto, nenhum componente da fração apresentou atividade antimicrobiana. No controle da formulação, onde foi colocado apenas a formulação e o caldo, sem a presença do inóculo, não houve crescimento, logo, as formulações não estavam contaminadas. No controle do meio, onde foi colocado apenas o meio de cultura utilizado (caldo Muller-Hinton) sem o inóculo também não houve crescimento, portanto, o meio de cultura não estava contaminado.

Em 2017, Mikulcová e colaboradores, formularam nanoemulsões O/A com o óleo de semente de cânhamo, que possui efeito antibacteriano relatado contra *S. aureus* e *Micrococcus luteus*. As formulações demonstraram estabilidade quando utilizada a proporção de 10% de tensoativo na nanoemulsão, porém, não foram capazes de melhorar a atividade antimicrobiana do óleo. Entretanto, não é possível fazer uma comparação direta entre nanoemulsões formuladas com óleo essencial e extrato de plantas, pois os óleos são constituídos por terpenos, que são moléculas muito diferentes dos fenólicos que constituem a fração AcOEt de *P. spruceanum*.

5.4 Ensaio de liberação

5.4.1 Determinação das condições sink (solubilidade)

Realizou-se o teste de solubilidade com o objetivo de escolher um meio receptor adequado para a solubilização da fração acetato etilênica de *P. spruceanum*.

Para se realizar um teste de liberação é necessário que se estabeleça as condições *sink*, visto que a escolha do meio receptor é um fator determinante para o teste de liberação *in vitro*. As condições *sink* têm por finalidade garantir que o meio receptor não atue como limitante da liberação do ativo da formulação por estar

saturado. O meio deve possibilitar que manutenção as condições sink durante o experimento à temperatura de 37 °C e a concentração do ativo no meio de liberação não deve ser superior a 20% da sua concentração de saturação (MANADAS et al, 2002).

Visando melhor adequar as condições ao teste de atividade, primeiramente, tentou-se solubilizar a fração em caldo Muller-Hinton, porém, não houve solubilização em nenhuma das concentrações testadas (0,5mg/mL, 0,25mg/mL e 0,125mg/mL), após uma hora no ultrassom. Então, preparou-se uma solução com 10% DMSO, 30% EtOH e 60% PBS e houve solubilização da fração neste meio.

Para a quantificação da quantidade de fenólicos existentes na fração, foi elaborada uma curva padrão do ácido gálico, obtendo-se a equação:

$$y = 0,0081x + 0,1266$$

$$R^2 = 0,9914$$

Para confirmar a solubilização, quantificou-se os fenólicos totais presentes na fração solubilizada no meio utilizando a curva padrão de ácido gálico obtida. A concentração de 5 mg/mL de fração em meio receptor apresentou 105,48 µg EAG/mL.

A fração solubilizada em etanol (solvente que garante a total solubilização da fração) na concentração de 5 mg/mL apresentou teor de fenólicos de 181,09 µg EAG/mL. Dessa forma, os resultados de solubilidade da fração no meio testado (5 mg/mL) demonstram que o meio é capaz de solubilizar 84,64% dos compostos presentes (diferença não estatisticamente significante em relação a solubilização com etanol).

Considerando 200 mL de meio receptor utilizado no teste de liberação, a concentração máxima de fenólicos totais (considerando 100% de liberação) seria 0,025 mg de fração por mL, equivalente a 0,5274 µg EAG/mL. Dessa forma, a solução utilizada como meio receptor garante as condições *sink*.

5.4.2 Ensaio de liberação

O ensaio de liberação da fração foi realizado com as duas formulações que continham a fração de *P. spruceanum*, a quantificação da liberação de fração foi realizada através da determinação de fenólicos totais liberados no meio receptor.

Amparo, 2016, sugeriu que a atividade antimicrobiana de *P. spruceanum* está atribuída a compostos fenólicos, como taninos e flavonoides. Dessa forma, o teor de fenólicos totais foi utilizado para quantificação no ensaio de liberação.

A quantificação de fenólicos totais pode ser realizada por uma variedade de técnicas, sendo a técnica espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu a mais utilizada, apesar de ser um método que sofre muitas interferência e poder superestimar o valor de fenólicos totais. O reagente de Folin-Ciocalteu, após reagir com os compostos fenólicos, produz coloração azul que pode ser medida em 750 nm (SOUSA et al, 2007).

Na avaliação de sensibilidade do método foi visto que até a concentração $9,766 \times 10^{-5}$ mg/mL de fração foi possível fazer a determinação de fenólicos totais. Foi elaborada uma curva padrão dos fenólicos existentes na fração, obtendo-se a seguinte curva:

$$y = 10,922x + 0,0124$$

$$R^2 = 0,9911$$

Na quantificação da liberação da formulação, em nenhum tempo testado houve quantidade quantificável da fração no meio receptor, ou seja, não foi liberado mais que 0,0976 µg/mL. Essa concentração mínima detectável é abaixo da CIM da fração.

Sugere-se, portanto, que a ausência de atividade das nanoemulsões é devido à problemas na liberação da formulação, possivelmente devido à interação dos bioativos da fração com os tensoativos.

6 CONCLUSÕES

Foram desenvolvidas nanoemulsões A/O e O/A monodispersas com a fração acetato etilênica de *P. spruceanum*. A formulação O/A indica ser estável quando caracterizada por tamanho e polidispersão das partículas. Os lipossomas e etossomas não demonstraram estabilidade quando formulados com a fração de interesse.

Apesar dos adequados resultados de caracterização, as nanoemulsões não foram capazes de reproduzir a atividade antimicrobiana da fração.

Sugere-se que esse resultado é devido à interação dos compostos bioativos com os componentes da formulação, indicado pela ausência de liberação no teste de diálise. Dessa forma, ainda são necessários estudos sobre compatibilidade.

REFERÊNCIAS

AFFANDI, M. M.; JULIANTO, T.; MAJEED, A. "Development and stability evaluation of astaxanthin nanoemulsion". **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 4, p. 142-148, 2011.

AMPARO, T. R. "Análise fitoquímica e bioprospecção para atividade antimicrobiana de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler" Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, 2016.

AMPARO, T. R.; RODRIGUES, I. V.; SEIBERT, J. B.; SOUZA, R. H. Z.; DE OLIVEIRA, A. R.; CABRAL, V. A. R.; VIEIRA, P. M. DE A.; BRANDÃO, G. C.; OKUMA, A. A.; FILHO, S. A. V.; TEIXEIRA, L. F. M.; SOUZA, G. H. B. DE. "Antibacterial activity of extract and fractions from branches of *Protium spruceanum* and cytotoxicity on fibroblastos". **Natural Product Research**, 2017

Antimicrobianos – bases teóricas e uso clínico. **ANVISA**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/quinolonas2.htm> Acesso em: 8 de outubro de 2016.

BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O. D. L.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, T. L. G. "Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March". **Quimica Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1078-1080, 2002.

BANNO, N.; AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; TOKUDA, H.; TABATA, K.; NAKAMURA, Y.; NISHIMURA, R.; KIMURA, Y.; SUZUKI, T. Anti-inflammatory activities of the triterpene acids from the resin of *Boswellia carteri*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.107, p. 249–253, 2006.

BURANASUKSOMBAT, U.; KWON, Y. J.; TURNER, M.; BHANDARI, B. "Influence of Emulsion Droplet Size on Antimicrobial Properties". **Food Science Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 793-800, 2011.

CAMARDA, L.; DAYTON, T.; DI STEFANO, V.; PITONZO, R.; SCHILLACI, D. "Chemical composition and antimicrobial activity of some oleogum resin essential oils from *Boswellia* spp. (Burseraceae)", **Annali di Chimica**, v. 97, 2007.

CARPENTER, J. & SAHARAN, V. K. "Ultrasonic assisted formation and stability of mustard oil in water nanoemulsion: Effect of process parameters and their optimization". **Ultrasonics Sonochemistry**, 2016.

CHEN, G. & TAO, D. "An experimental study of stability of oil–water emulsion". **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 499– 508, 2005.

COWAN, M. M. "Plant Products as Antimicrobial Agents". *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 4, p. 564–582, 1999.

DONSI, F.; ANNUNZIATA, M.; VINCENSI, M.; FERRARI, G. "Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier". **Journal of Biotechnology**, v. 159, p. 342–350, 2012.

DUARTE, M. C. T. "Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil". **MultiCiência**, v. 07, 2006.

DUWIEJUA, M.; ZEITLIN, I. J.; WATERMAN, P. G.; CHAPMAN, J.; MHANGO, C. J.; PROVAN, C. J. "Anti-Inflammatory Activity of Resins from some Species of the Plant Family Burseraceae". **Planta Medica**. v. 59, n. 1, p. 12-6, 1993.

ELOFF, J. N. "A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria". **Planta Medica**, v. 64, p. 711—713, 1998.

FINE, P. V. A.; DALY, D. C.; MUÑOZ, G. V.; MESONES, I.; CAMERON, K. M. "The contribution of edaphic heterogeneity to the evolution and diversity of Burseraceae trees in the western Amazon." **Evolution** v. 59, p. 1464–1478, 2005.

FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. "Antibiotics for Emerging Pathogens". **Science** v. 325, p. 1089, 2009.

FLORENCE, Alexander T.; ATTWOOD, David. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 2 ed. São Paulo: Pharmabooks, 2011. 332-333 p.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; DA SILVA Júnior, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. "Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos". **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 03, 2005.

GILBERT, B.; ALVES L. F. Synergy in Plant Medicines. **Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 13-20, 2003.

GODIN, B.; TOUITOU, E.; RUBINSTEIN, E.; ATHAMNA, A.; ATHAMNA, M. "A new approach for treatment of deep skin infections by an ethosomal antibiotic preparation: an in vivo study". **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 989–994, 2005.

GRIMALDI, N., ANDRADE, F., SEGOVIA, N., FERRER-TASIES, L., SALA, S., VECIANA, J. and VENTOSA, N. "Lipid-based nanovesicles for nanomedicine". **The Royal Society of Chemistry**, 2016.

GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous application. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

HAMOUDA, T.; MYC, A.; DONOVAN, B.; SHIH, A. Y.; REUTER, J. D.; BAKER, J. R. "A novel surfactant nanoemulsion with a unique non-irritant topical antimicrobial activity against bacteria, enveloped viruses and fungi". **Microbiology Research**, v. 156, p. 1-7, 2001.

KHAN, B. A.; AKHTAR, N.; KHAN, H. M. S.; WASEEM, K.; MAHMOOD, T.; RASUL, A.; IQBAL, M.; KHAN, H. "Basics of pharmaceutical emulsions: A review". **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n 25, p. 2715-2725, 2011.

LA RICA, R. de; AILI, D.; STEVENS, M. M. "Enzyme-responsive nanoparticles for drug release and diagnostics". **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 967–978, 2012.

LEAL, L. B.; SOUSA, G. D.; SEIXAS, K. B.; SOUZA, P. H. N.; DE SANTANA, D. P. "Determination of the critical hydrophile-lipophile balance of licuri oil from *Syagrus coronata*: application for topical emulsions and evaluation of its hydrating function". **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 1, 2013

LIMA, L. R. & PIRANI, J. R. Burseraceae. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. **Instituto de Botânica**, São Paulo, v. 4, p: 163-168, 2005.

LIMA, T. A. A. C.; ROCHA, K. R. A.; MELO, M. F. F.; Marcia Ortiz Mayo MARQUES, FACANALI, R.; LIMA, M. P. "Aspectos morfológicos e químicos de *Protium spruceanum*: uma contribuição ao conhecimento de espécies aromáticas do bosque da ciência do inpa". **Scientia Amazonia**, v. 3, n. 2, p. 6-10, 2014.

LIN, Y.; CHIOU, S.; LAI, C.; TSAI, S.; CHOU, C.; PENG, S.; HE, Z. "Formulation and evaluation of water-in-oil amoxicillin-loaded nanoemulsions using for *Helicobacter pylori* eradication". **Process Biochemistry** v. 47, p. 1469–1478, 2012.

LIU, W.; SUN, D.; LI, C.; LIU, Q.; XU, J. "Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method". **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 303 p. 557–563, 2006.

MACHADO, L. C.; GNOATT, S. A.; KLÜPPEL, M. L. W. "Lipossomas aplicados em farmacologia: Uma revisão da literatura". **Estudos de Biologia**, v. 29, n. 67, p. 215-224, 2007.

MACHADO, L. B.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. "Seasonal variation in the composition of the essential oils from the leaves, thin branches and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl." **Wiley InterScience**, v 18, p. 338–341, 2003.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Brazilian Journal of Pharmaceithical Sciences**, v. 38, n. 4, p. 375 - 399, 2002.

MAURER, N.; WONG, K. F.; HOPE, M. J.; CULLIS, P. R. "Anomalous solubility behavior of the antibiotic ciprofloxacin encapsulated in liposomes: a ¹H-NMR study". **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1374, n. 1–2, p. 9–20, 1998.

MIKULCOVÁ, V.; KAŠPÁRKOVÁ, V.; HUMPOLÍCEK, P.; BUNKOVÁ, L. "Formulation, Characterization and Properties of Hemp Seed Oil and Its Emulsions". **Molecules**, v. 22, p. 700, 2017.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. "Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais". **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PEREIRA, T. A. "Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A a base de óleo de framboesa, maracujá e pêssego: Avaliação de propriedades cosméticas da formulação". Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, 2011.

PINTO-ALPHANDARY, H.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P. "Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications". **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, p. 155–168, 2000.

ROCHA, K. R. A.; MELO, M. F. F.; Contribuição ao conhecimento da família Burseraceae do campus do INPA e Bosque da Ciência, Manaus – AM. **Resumos do 56º Congresso Nacional de Botânica**, 2005.

PONTES, W. J. T.; DE OLIVEIRA, J. C. G.; DA CÂMARA, C. A. G.; LOPES, A. C. H. R.; JÚNIOR, M. G. C. G.; DE OLIVEIRA, J. V.; BARROS, R.; SCHWARTZ, M. O. E. "Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae)". **Acta Amazonica**, v. 37, n 1, 2007.

RODRIGUES, I. V.; SOUZA, J. N. de P.; SILVA, A. C. G.; CHIBLI, L. A.; CABRAL, V. A. R.; VIERA Filho, S. A.; PERAZZO, F. F.; GUIMARÃES, A. G.; SOUZA G. H. B. de. "Antiedematogenic and antinociceptive effects of leaves extracts from *Protium spruceanum* Benth. (Engler)". **Pharmacognosy Journal**, v. 5, p. 6-12, 2013.

SHAO, M.; HUSSAIN, Z.; THU, H. E.; KHAN, S.; KATAS, H.; AHMED, T. A.; TRIPATHY, M.; LENG, J.; QIN, H.; BUKHARI, S. N. A. "Drug Nanocarrier, the Future of Atopic Diseases: Advanced Drug Delivery Systems and Smart Management of Disease". **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2016.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. "Liposomes in drug delivery: progress and limitations". **International Journal of Pharmaceutics**, v. 154, p. 123 – 140, 1997.

SOUSA, C. M. DE M.; SILVA, H. R. E; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; DA COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. DE M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. "Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais". **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351 – 355, 2007.

TADROS, T., IZQUIERDO P., ESQUENA J., SOLANS C.. "Formation and stability of nano-emulsions". **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108 – 109; p. 303–318, 2004.

TAYLOR, P. W. "Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents". **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2013.

TOMÁS-MENOR, L.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; SEGURA-CARRETERO, A.; MARTÍ, N.; SAURA, D.; MENÉNDEZ, J.A.; JOVEN, J.; MICOL, V. The Promiscuous and Synergic Molecular Interaction of Polyphenols in Bactericidal Activity: An Opportunity to Improve the Performance of Antibiotics? **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 1, p. 466–473, 2015.

TONIAZZO, T. “Dispersões de lipossomas encapsulando β -caroteno: caracterização, estabilidade físico-química e incorporação em iogurte”. Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

VERMA, P. & PATHAK, K. “Therapeutic and cosmeceutical potential of ethosomes: An overview”. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 3, 2010.

VERMA, P. & PATHAK, K. “Nanosized ethanolic vesicles loaded with econazole nitrate for the treatment of deep fungal infections through topical gel formulation”. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, p. 489–496, 2012.

VIOLANTE, I. M. P.; HAMERSKI, L.; GARCEZ, W. S.; BATISTA, A. L.; CHANG, M. R.; POTT, V. J.; GARCEZ, F. R.; “Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central western region of Brazil”, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1302–1308, 2012.

VON NUSSBAUM, F.; BRANDS, M.; HINZEN, B.; WEIGAND, S.; HÄBICH, D. “Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry - Exodus or Revival?”. **Angewandte Chemie** (International ed) v. 45, p. 5072 – 5129, 2006.

WEBSTER, J. T. S. T. J. “Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature”. **International Journal of Nanomedicine**, v. 07 p. 2767–2781, 2012.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. “Composition of the Essential Oils from Leaves, Wood, Fruits and Resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl.” **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, n. 3, p. 169-171, 2002.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

CERTIFICADO DE CORREÇÃO

Certifico que o(a) Aluno(a) Lígia Jacamir Gonçalves, matrícula 11.2.2042 defendeu o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado Desembaçamento de gemulações na estruturação contendo gração de Potium spruceanum e atividade antimicrobiana em 22 de Agosto de 2017 e **REALIZOU TODAS AS CORREÇÕES REQUERIDAS PELA COMISSÃO AVALIADORA.**

Ouro Preto, 30/08/2017

Tatiana Raquel Amaro

Assinatura do(a) orientador(a)