



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO DE GERANIOL E
ÓLEO ESSENCIAL DA PALMAROSA (*Cymbopogon martinii*) E
SUA AÇÃO INIBITÓRIA SOBRE LINHAGENS DE *Cutibacterium*
acnes.

LUCIANA PUPO DA SILVEIRA LYRA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu/SP para a obtenção do título de Mestre no programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biologia de Parasitas e Micro-organismos

Professor Adjunto Ary Fernandes Junior



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO DE GERANIOL E
ÓLEO ESSENCIAL DA PALMAROSA (*Cymbopogon martinii*) E
SUA AÇÃO INIBITÓRIA SOBRE LINHAGENS DE *Cutibacterium*
acnes.

LUCIANA PUPO DA SILVEIRA LYRA

PROF. ADJUNTO ARY FERNANDES JUNIOR

PROF^a Dra CARLA DOS SANTOS RICCARDI

Dra BRUNA FERNANDA MURBACH TELLES ANDRADE

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu/SP como requisito necessário para a obtenção do título de Mestre no programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada. Área de concentração: Biologia de Parasitas e Micro-organismos

Orientador: Professor Adjunto Ary Fernandes Junior

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Lyra, Luciana Pupo da Silveira.

Desenvolvimento de nanoemulsão de geraniol e óleo essencial da palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e sua ação inibitória sobre linhagens de *Cutibacterium acnes* / Luciana Pupo da Silveira Lyra. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ary Fernandes Junior

Coorientador: Carla dos Santos Riccardi

Coorientador: Bruna Fernanda Murbach Telles Andrade

Capes: 21202001

1. Essências e óleos essenciais. 2. Nanopartículas. 3. Emulsões.
4. *Cymbopogon*. 5. *Propionibacterium acnes*.

Palavras-chave: *Cutibacterium acnes*; *Cymbopogon martinii*;
Nanoemulsões; Nanopartículas de prata; Óleos essenciais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me capacitado para alcançar meus objetivos.

Agradeço aos meus pais, Tadeu e Rita, por sempre apoiarem e incentivarem meus estudos e por nunca medirem esforços para que eu e meu irmão pudéssemos nos preparar para enfrentar os desafios da vida.

Ao meu orientador Ary Fernandes Junior por ter aceitado o desafio de me orientar e por sua disposição em transmitir seu conhecimento aos alunos; minha co-orientadora Professora Carla dos Santos Riccardi com quem aprendi muito e que admiro como profissional e mulher e minha também co-orientadora Bruna F. M. Telles Andrade que me ensinou e auxiliou sempre que precisei e que me inspirou a ser uma pessoa melhor.

As colegas do Laboratório de Bacteriologia e Produtos Naturais - L.A.B.A.P.: Alessandra, Ana Flávia, Mariana e Fernanda por me ajudarem e compartilharem conhecimentos, angustias e alegrias. Torço muito por cada uma delas!

A meu melhor e querido amigo, José Sérgio, por estar sempre presente, independente da distância.

Ao meu chefe no trabalho, Célio A. Carmelin, por ter me permitido realizar o mestrado e compreendido algumas ausências.

Aos amigos que o mestrado me trouxe, pelos risos, as dicas e as conversas, bons momentos que jamais irei esquecer.

Ao Martin Kassio L. da Silva, Marcelo Felipe Matias e José Eduardo G. Montanha, assistentes de suporte acadêmico (ASA) da Unesp de Botucatu, campus Lageado, por me explicarem como trabalhar nos laboratórios do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e providenciarem tudo o que precisei para realizar meus experimentos.

A Agda J. de Freitas Galletti pela orientação na parte de estatística.

Agradeço aos profissionais da Unesp de Araraquara por dedicarem um pouco de seu tempo para a realização de meu projeto. Em Araraquara agradeço especialmente: a Dra. Valéria Maria O. Cardoso, do Departamento de Fármacos e Medicamentos, Laboratório de Farmacotécnica por ter sido extremamente atenciosa e me explicado como utilizar o equipamento para análise da viscosidade; ao Dr. Alberto Alécio, do Instituto de Química, por ter me acompanhado nas análises de Espectroscopia Infravermelho com transformada de Fourier; ao aluno de iniciação científica do Departamento de Fármacos e Medicamentos Felipe Tita Lima que realizou os testes de potencial zeta, tamanho e polidispersividade de nanocompostos; ao Dr. Diego Luiz Tita, do Instituto de Química, pelas imagens realizadas no Microscópio Eletrônico de Varredura; Dra Cláudia Tavares dos Santos, assistente de suporte acadêmico (ASA), que me ensinou sobre análises de citotoxicidade e finalmente aos professores Marlus Chrorilli e Rosemeire C. L. Rodrigues Pietro do Departamento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFar), por serem tão solícitos e prontos quando precisei usar equipamentos de seus laboratórios ou aprender uma nova metodologia.

Em Bauru, na Unesp, agradeço a Bruna Costa por ter realizado e dedicado seu tempo para ler minhas amostras e me explicar sobre o funcionamento do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

Assim, deixo aqui meu muito obrigada do fundo do coração a todos que contribuíram para a realização deste estudo!

Lista de Figuras:

Figura1. Destilação á vapor para obtenção de óleos essenciais. neste processo somente o vapor passa através do material vegetal carreando o óleo essencial, esta mistura do óleo volatilizado e vapor é condensada então óleo essencial e água são captados e separados pela diferença de densidade. Fonte: Tongnuanchan e Benjakul, 2014.	22
Figura 2. Representação histológica das camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme (camada subcutânea). Fonte: Pereira, 2011	25
Figura 3. Mecanismos de desestabilização de emulsões. Note que processos diferentes podem ocorrer simultaneamente. Fonte: Almeida, 2014	39
Figura 4. Esquema representativo de nanoemulsão (a) e nanopartícula lipídica sólida (b). Fonte: Mueller et al.,2000.	41
Figura 5. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas. Fonte: Michels, 2016.	46
Figura 6. Estrutura química e caracterização dos tensoativos utilizados no preparo da nanoemulsão.	53
Figura 7. Cromatografia gasosa (GC/DIC) do óleo essencial de palmarosa.	68
Figura 8. Valores de pH medidos no intervalo de tempo de 0, 40, 120 e 270 dias para as formulações de óleo essencial de palmarosa (OE) e geraniol (G) nas condições de EHL 6,78 (OE1 e G1) (A), 8,02 (OE2 e G2) (B), 9,26 (OE3 e G3) (C), 10,50 (OE4 e G4) (D) e 11,74 (OE5 e G5) (E).	72
Figura 9: Valores de condutividade elétrica medidos no intervalo de tempo de 0, 40, 120 e 270 dias para as formulações de óleo essencial de palmarosa (OE) e geraniol (G) nas condições de EHL 6,78 (OE1 e G1) (A), 8,02 (OE2 e G2) (B), 9,26 (OE3 e G3) (C), 10,50 (OE4 e G4) (D) e 11,74 (OE5 e G5) (E).	75
Figura 10. Medidas de FTIR-ATR para a nanoemulsão G1.	84
Figura 11. Medidas de FTIR-ATR para a nanoemulsão de OE1.	84
Figura 12. . Imagens do MEV para a nanoemulsão de óleo essencial 1 realizadas no microscópio eletrônico da Unesp de Bauru. A) Aumento de 1000x; B) Aumento de 100x; C)Aumento de 200x.	88
Figura 13. MEV-FEG da nanoemulsão de óleo essencial da palmarosa, formulação número 1 ou OE1, realizada no campus de Araraquara. A) Aumento de 2000x; B) Aumento de 300x.	90
Figura 14. Fotomicrografia da nanoemulsão OE2. Aumento de 400x.	91

Nota-se a diferença entre o tamanho dos glóbulos dispersos

Figura 15: Curvas de sobrevivência para verificação das interações entre as diferentes combinações de antimicrobianos e o fármaco padrão (clindamicina). 112

Lista de Quadros:

Quadro 1. Compostos utilizados nos testes microbiológicos e cepas ATCC usadas em cada teste.	61
---	----

Lista de Tabelas:

Tabela 1. Formulações para nanoemulsões com seus respectivos valores de EHL.	54
Tabela 2. Composição química (%) do óleo essencial de palmarosa (<i>Cymbopogon martinii</i>).	68
Tabela 3. Valores de EHL para os surfactantes utilizados.	70
Tabela 4. Composição das nanoemulsões preparadas com o óleo essencial (formulações com a sigla OE) e geraniol (formulações G).	71
Tabela 5. Avaliação do valor de pH das nanoemulsões de palmarosa (OE1 a OE5) e das nanoemulsões de geraniol (G1 A G5) em diferentes tempos de preparação. A leitura foi realizada a temperatura ambiente de 25°C.	72
Tabela 6. Avaliação do pH das nanoemulsões de palmarosa e das nanoemulsões de geraniol após teste do estresse térmico a 80°C.	74
Tabela 7: Medidas de densidade de cada formulação de nanoemulsão. OE1 á OE5 representam as nanoemulsão preparadas com o óleo essencial de palmarosa e as formulações chamadas de G1 á G5, são nanoemulsões de geraniol.	78
Tabela 8: Medidas do teste de centrifugação de cada formulação de nanoemulsão. OE1 á OE5 representam as nanoemulsão preparadas com o óleo essencial de palmarosa e as formulações chamadas de G1 a G5, são nanoemulsões de geraniol.	80
Tabela 9. Análise do estresse térmico para cada formulação de nanoemulsão. OE1 á OE5 representam as nanoemulsão preparadas com o óleo essencial de palmarosa e as formulações chamadas de G1 a G5, são nanoemulsões de geraniol.	81
Tabela 10. Bandas de leitura FTIR-ATR.	82
Tabela 11. Análise da viscosidade das nanoemulsões de palmarosa e de geraniol, após o preparo e após 6 meses armazenadas a temperatura ambiente.	86
Tabela 12. Potencial zeta, tamanho e polidispersividade (PDI) das amostras analisadas. Dados da densidade, EHL das preparações e viscosidade média também estão incluídos.	95
Tabela 13. Atividade antimicrobiana do óleo essencial da palmarosa, do geraniol e da clindamicina sobre três cepas-padrão ATCC de <i>C. acnes</i> .	96

Tabela 14. Atividade antimicrobiana do óleo essencial da palmarosa, do geraniol e da clindamicina sobre duas cepas-padrão ATCC de <i>S. epidermidis</i> .	96
Tabela 15. Testes de atividade antimicrobiana preliminar das nanoemulsões de OE da palmarosa (OE1 á OE5) e das nanoemulsões do geraniol (G1 á G5) recém-preparadas.	101
Tabela 16. Atividade antimicrobiana das nanoemulsões OE3 e G3 e da clindamicina (que não está incluída em uma nanoemulsão) sobre três cepas-padrão ATCC <i>C. acnes</i> ..	102
Tabela 17. Atividade antimicrobiana da nanoemulsão OE3 da palmarosa, de G3 de geraniol e da clindamicina (que não está incluída em uma nanoemulsão) sobre <i>S. epidermidis</i> .	104
Tabela 18 Atividade antimicrobiana da nanoemulsão de óleo essencial OE3 +AgNP, da nanoemulsão de geraniol G3 + AgNP e da clindamicina (que não está incluída em uma nanoemulsão) sobre três cepas-padrão ATCC de <i>C. acnes</i>	106
Tabela 19. Comparativo entre valores de CIM e CBM dos compostos	107.
Tabela 20. Resultados do método de disco difusão de Kirby-Bauer.	109
Tabela 21. Curva de Sobrevivência para a bactéria ATCC 6919, nos tempos 0, 6, 12, 24 e 42 horas. Resultados em log de UFC/mL.	111

Lista de Abreviaturas:

OE: óleo essencial

OE1: Formulação número 1 da nanoemulsão contendo óleo essencial de Palmarosa

OE2: Formulação número 2 da nanoemulsão contendo óleo essencial de Palmarosa

OE3: Formulação número 3 da nanoemulsão contendo óleo essencial de Palmarosa

OE4: Formulação número 4 da nanoemulsão contendo óleo essencial de Palmarosa

OE5: Formulação número 5 da nanoemulsão contendo óleo essencial de Palmarosa

G1: Formulação número 1 da nanoemulsão contendo geraniol

G2: Formulação número 2 da nanoemulsão contendo geraniol

G3: Formulação número 3 da nanoemulsão contendo geraniol

G4: Formulação número 4 da nanoemulsão contendo geraniol

G5: Formulação número 5 da nanoemulsão contendo geraniol

AgNP: Nanopartícula de Prata

MHC: Mueller Hinton Caldo

RCA: *Reinforced Clostridium Agar*

CIM Concentração Inibitória Mínima

CBM Concentração Bactericida Mínima

REMA *Resazurin Microtiter Assay Plate*

FTIR-ATR: Análise Espectroscópica Infravermelho por Transformada de Forrier, com Sensor de Reflectância total Atenuada

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

CG/DIG: Cromatografia gasosa com detector de ionização de cham

EHL: Equilíbrio hidrofílico- lipofílico

O/A: Emulsão Óleo em água

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Lista de Símbolos

%: Porcentagem

°C :Graus Celsius

mL: Milímetro

rpm: Rotações por minuto

nm: Nanômetro

μm :Micrômetro

mm: Milímetro

μL :Microlitro

mg: Miligrama

min :Minuto

cm: Centímetro

Pa.S: pascal-segundo (ou $1 \text{ N} \cdot \text{s}/\text{m}^2$)

uS.cm: microsiemens por centímetro

m/m: porcentagem massa/massa

mv: microvolts

Resumo: Os óleos essenciais (OE) são produtos do metabolismo secundário da planta e são conhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas. O principal componente do OE da palmarosa é o geraniol (70-80%). A incorporação de compostos da biodiversidade agrega valor as formulações dermocosméticas. OEs são uma boa opção devido à semelhança estrutural com o equilíbrio hidro-lipídico da pele. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade antibacteriana desses compostos e o desenvolvimento de protótipos de dermocosméticos com nanopartículas para o tratamento da acne vulgar. Nanoemulsões com OE e geraniol foram preparadas de acordo com os valores do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) e a caracterização das nanoemulsões seguiram os parâmetros da ANVISA (2004) para testes preliminares de estabilidade. Foram preparadas dez formulações. Nanoemulsões especiais contendo nanopartículas de prata (AgNP) foram preparadas e testadas contra *C. acnes*. Os ensaios de microtitulação com resazurina (REMA) foram realizados para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) para o OE de palmarosa e geraniol contra cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Cutibacterium acnes* 11827, 11828 e 6919. A curva de sobrevivência (CS) foi realizada para analisar o sinergismo entre os compostos e a clindamicina contra *C. acnes*, cepa 6919. As formulações foram estáveis ao pH, condutividade elétrica, densidade, centrifugação e análise de stress térmico. Análises de tamanho, potencial zeta (ZP) e índice de polidispersão (PDI) ficaram entre 60 e 165 d.nm; -16,6 e -34,8 mv e 0,043 até 0,253, respectivamente. A conclusão foi que a formulação de número 3 foi a melhor, porque permaneceu translúcida e apresentou valores de -25,6 mv para ZP; o menor tamanho (63,3 d.nm) e PDI de 0,253, valores ideais segundo a literatura. Análises de espectroscopia (ATR-FTIR) e microscopia (Microscópio Eletrônico de Varredura) foram realizadas. Os valores de CIM e CBM diminuíram para as cepas 11827 (de 1250 para 39,06 µg/mL) e para a cepa 11828 (de 5000 para 312,5 µg/mL) quando os compostos foram incluídos em nanoemulsões e quando o AgNP foi adicionado à formulação. Tamanhos menores de gota facilitam a penetração do composto ativo. A CS apresentou ação bactericida para OE e geraniol e sinergismo bacteriostático para os diferentes tratamentos. Assim, pode-se concluir que as nanoemulsões foram bem sucedidas em sua preparação e possuem potencial antimicrobiano.

Palavra-Chave: óleos essenciais, nanoemulsões, *Cymbopogon martinii*, *Cutibacterium acnes*, nanopartículas de prata, estabilidade preliminar, *Propionibacterium acnes*

NANOEMULSION FROM GERANIOL AND ESSENTIAL OIL OF PALMAROSA (*Cymbopogon martinii*) AND ITS INHIBITORY ACTION AGAINST *Cutibacterium acnes* STRAINS.

Essential oils (EO) are secondary metabolism products of plant and they are known for antimicrobial properties. The major component of palmarosa EO is geraniol (70-80%). Incorporation of compounds of biodiversity guarantee value to dermocosmetic formulations. EOs are good option due to structural similarity with skin hydro-lipid balance. Thus, the desire was to evaluate the antibacterial activity to these compounds and the development of dermocosmetic prototypes with nanoparticles to treat acne vulgaris. Nanoemulsion with EO and geraniol were prepared according to values of lipophilic-hydrophilic balance (LHB) and nanoemulsions characterization followed the ANVISA (2004) parameters for preliminary stability tests. Ten formulations were prepared. Special nanoemulsion containing silver nanoparticles (AgNP) was prepared and tested against *C. acnes*. Resazurin Microtiter Assays (REMA) was performed to determine the Minimum inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for palmarosa EO and geraniol against American Type Culture Collection (ATCC) strains of *Cutibacterium acnes* 11827, 11828 and 6919. The target of Time Kill Curve (TKC) test was determinate the synergism between compounds and clindamycin to *C. acnes* strain 6919. The formulations were stable to pH, electrical conductivity, density, centrifugation and thermal stress analysis. Analysis of size, zeta potential (ZP) and polydispersity index (PDI) were between 60 and 165 d.nm; -16.6 and -34.8 mv and 0.043 until 0.253, respectively. The conclusion was formulation number 3 was the best, because remained translucent and had values of -25.6 mv for ZP; the lowest size (63.3 d.m) and PDI of 0.253, ideal values according to literature. Analysis of spectroscopy (ATR-FTIR) and microscope (Scanning Electron Microscopy) were done. MIC and MBC values decreased for 11827 strain (from 1250 to 39,06 µg /mL) and for 11828 strain (from 5000 to 312,5 µg /mL) when the compounds was included in nanoemulsions and when AgNP was added in the formulation. Smaller droplet sizes facilitate penetration of the active compound. The TKC had bactericidal action for OE and geraniol and bacteriostatic synergism for different treatments. Thus, we can conclude that the nanoemulsions were successful in their preparation and have antimicrobial potential.

Key words: essential oils, nanoemulsions, *Cymbopogon martinii*, *Cutibacterium acnes*, silver nanoparticles, preliminary stability, *Propionibacterium acnes*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Óleos Essenciais.....	20
2.2 Palmarosa (<i>Cymbopogon martinii</i>)	23
2.3 A pele.....	24
2.3.1 A Microbiota da Pele.....	26
2.3.2 <i>Cutibacterium acnes</i>	28
2.4 Resistência bacteriana e Produtos Naturais	31
2.4.1 <i>Cutibacterium acnes</i> e Resistência Bacteriana.....	34
2.5 Cosméticos, Dermocosméticos e Emulsões	35
2.6 Sistemas Nanoestruturados e Nanoemulsões	39
2.6.1 Nanopartícula de Prata (AgNP).....	47
2.7 Nanotecnologia e Cosméticos.....	49
3. OBJETIVOS.....	51
3.1 Objetivos Gerais	51
3.2 Objetivos Específicos	51
4. MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 Obtenção dos compostos testados (OE de <i>Cymbopogon martinii</i> e geraniol)	52
4.2 Caracterização do Óleo Essencial de Palmarosa.....	52
4.3 Preparo das Nanoemulsões.....	53
4.3.1 Tensoativos Utilizados	53
4.4 Caracterizações das Nanoemulsões	55
4.4.1 Avaliação Macroscópica.....	55
4.4.2 Testes de Estabilidade	55
4.4.2.1 Cor	55

4.4.2.2	Teste de Centrifugação	55
4.4.2.3	Estresse Térmico	55
4.4.2.4	Tamanho Médio das Partículas/Potencial Zeta	56
4.4.2.5	Determinação do valor do pH	56
4.4.2.6	Condutividade	56
4.4.2.7	Viscosidade	56
4.4.2.8	Densidade.....	57
4.4.3	Análises Microscópicas	57
4.4.3.1	Caracterização Morfológica pela Técnica de Microscopia Óptica	57
4.4.3.2	Caracterização Morfológica pela técnica de MEV-FEG.....	57
4.4.3.3	Caracterização química e estrutural por FTIR-ATR.....	58
4.5	Preparação das Nanopartículas de Prata (AgNP).....	58
4.5.1	Síntese Verde de AgNP	59
4.6	Atividade Antimicrobiana	60
4.6.1	Concentração Inibitória Mínima(CIM) e Concentração Bactericida Mínima(CBM)	62
4.6.2	Disco Difusão.....	64
4.6.3	Curva de Sobrevivência (<i>Time Kill Curve</i>)	65
4.7	Análise Estatística.....	66
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1	Análise do Óleo Essencial da Palmarosa por CG/DIC	67
5.2	Testes Preliminares de Estabilidade Físico-Química das Nanoemulsões	69
5.2.1	Preparação	69
5.2.2	Valor de pH	71
5.2.3	Condutividade	74
5.2.4	Densidade	77
5.2.5	Teste de Centrifugação	78

5.2.6 Estresse Térmico	80
5.2.7 Caracterização por Espectroscopia na Região do Infravermelho Médio com Transformada de Forrier (ATR FTIR)	81
5.3.8 Viscosidade.....	85
5.3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura	87
5.3.10 Microscopia Óptica.....	91
5.3.11 Tamanho, Potencial Zeta e Índice de Polidispersividade	91
5.3.12 Análise Macroscópica e Cor.....	94
6. Atividade Antimicrobiana	95
6.1.1 Atividade Antimicrobiana do Geraniol e OE da Palmarosa	95
6.1.2 Atividade Antimicrobiana das Nanoemulsões OE e Geraniol	100
6.1.3 Atividade Antimicrobiana das Nanoemulsões com AgNP	104
6.1.4 Disco Difusão	108
6.1.5 Curva de Sobrevivência (<i>Time Kill Curve</i>)	109
7.. CONCLUSÃO	114
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

1. INTRODUÇÃO:

Os óleos essenciais são compostos líquidos, voláteis, límpidos, raramente coloridos, lipossolúveis ou solúveis em solventes orgânicos. Podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta e são resultantes do seu metabolismo secundário, sendo caracterizados por um odor forte e marcante. São constituídos de monoterpenos e sesquiterpenos e de fenilpropanóides, substâncias químicas que lhes conferem suas características organolépticas. São conhecidos pelas suas propriedades bactericida e fungicida, por suas propriedades medicinais e podem ser utilizados ainda no acondicionamento e preservação de alimentos na forma de embalagens bioativas (BAKKALI et al., 2007).

O nome popular do *Cymbopogon martinii* (Familia Poaceae) é Palmarosa. O óleo essencial da Palmarosa é geralmente utilizado como matéria-prima de perfumaria em sabões e perfumes (BURDOCK, 2010, RAO, 2001) e em produtos cosméticos e de higiene (DUBEY et al., 2000). O odor de seu óleo essencial é um suave cheiro de rosa floral com nota herbal, extraído de folhas e florações da planta. Seu composto majoritário é o geraniol (70-80%) (MALLAVARAPU et al., 1998).

Segundo a RDC N^o211 da ANVISA de julho de 2005 produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes são preparações de uso externo, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e ou protegê-los. Os produtos classificados como de grau II possuem indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia. Aqui se encaixam produtos para tratamento de acne, rugas, protetor solar, maquiagem com fotoprotetor, entre outros. Os produtos de grau II podem ser chamados de dermocosméticos ou cosmeceúticos e atuam em camadas mais profundas da pele sendo capazes de mudar fisiologicamente algumas condições, melhorando o aspecto físico da mesma (GONZÁLEZ E BAMIO, 2002).

A utilização de sistemas de distribuição à base de nanoemulsões tem surgido como uma potencial ferramenta para conceber novos produtos cosméticos e alimentares. Segundo a Farmacopéia Brasileira de 2012, emulsão é um sistema termodinamicamente instável constituído de duas fases com pelo menos dois líquidos imiscíveis dispersos. Sendo essas fases estabilizadas por meio de um ou mais agentes surfactantes. O que difere uma emulsão de uma nanoemulsão é que as nanoemulsões são compostas por gotículas de tamanhos compreendidos entre 10 e 200 nanômetros (escala nanométrica) (ODRIOZOLA-SERRANO et al., 2014).

O interesse comercial de óleos essenciais naturais como substâncias bioativas com propriedade antimicrobiana torna-se expressiva devido à demanda de produtos isentos de aditivos sintéticos (BURT, 2004).

Várias pesquisas recentes relataram a formação de nanoemulsões contendo óleos essenciais como uma estratégia para melhorar sua funcionalidade. Óleos essenciais incorporados em nanoemulsões levaram a um aumento da permeabilidade na membrana da bactéria (ZIANI et al.,2011), (DONSI et al.,2011), reduzindo a concentração para se obter um efeito antimicrobiano (LIANG et al.,2012), (SALVIA-TRUJILLO et al.,2014).

Neste contexto, o uso de produtos naturais tem agregado incrementos tecnológicos na área de dermocosméticos, especialmente para o tratamento de processos e afecções cutâneas, tais como a acne vulgar – doença cutânea manifestada pela presença do agente infeccioso *Cutibacterium acnes*, antes chamado de *Propionibacterium acnes*, que é uma bactéria anaeróbia Gram-positiva presente na pele da maioria das pessoas saudáveis, que em contato com os poros epiteliais promove a inflamação dos folículos pilosos (BHATIA et al.,2004).

Assim o estudo destaca as propriedades antibacterianas da espécie vegetal *Cymbopogon martinii*. As incorporações do óleo essencial de palmarosa, geraniol e partícula de prata em nanoemulsões foram avaliadas quanto ao potencial antimicrobiano *in vitro*, bem como controle da estabilidade físico-química em diferentes formulações farmacêuticas e condições de processamento experimental. Portanto, objetivou-se desenvolver sistemas promissores aplicados para o uso tópico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

2.1 Óleos Essenciais:

Desde tempos remotos, os produtos naturais são utilizados pela humanidade como importantes ferramentas nos procedimentos das terapias naturais (MUKHERJEE et al., 2010), objetivando o alívio e cura de doenças através do uso de ervas, sendo, possivelmente, uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (MACHADO E FERNANDES JUNIOR, 2011).

A história do desenvolvimento das civilizações oriental e ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais, tanto na medicina como no controle de pragas e em mecanismos de defesa, com destaque para a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa. Nos tempos atuais, muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados visando o entendimento de seu mecanismo de ação e isolamento dos princípios ativos. (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI, 2006). É crescente a utilização e a demanda de produtos naturais, em todo o mundo, especialmente devido aos problemas que são atribuídos a inúmeros produtos sintéticos para a saúde humana e para o meio ambiente. (BANDONI; CZEPAK, 2008). Além disso, houve um surgimento global de doenças causadas por micro-organismos multirresistentes devido ao uso inadequado de antimicrobianos (ROCA et al., 2015).

Muitos micro-organismos, incluindo bactérias, fungos, vírus, parasitas e protozoários, desenvolveram resistência aos fármacos antimicrobianos, sendo reconhecidos como um desafio global emergente (ROCA et al., 2015). A ocorrência onipresente de bactérias multirresistentes reduziu a eficácia da antibiótico-terapia atual, resultando em milhares de mortes por ano. Portanto, novas alternativas de antimicrobianos são urgentemente necessárias para amenizar o problema de resistência á várias drogas (ALLAHVERDIYEV et al., 2011). Neste contexto, extratos vegetais e óleos essenciais são capazes de exercerem atividade antimicrobiana ou realizam sinergismo com fármacos referência, levando ao desenvolvimento de uma nova abordagem terapêutica para tratamentos (RAIA et al., 2017). Eles podem agir contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de leveduras e fungos filamentosos (PRASHAR et al., 2003).

Desde a Idade Média, os óleos essenciais têm sido amplamente utilizados para aplicações bactericidas, virucidas, fungicidas, antiparasitárias, inseticidas, medicinais e cosméticas e atualmente nas indústrias farmacêutica, sanitária, cosmética, agrícola e alimentícia. Na natureza, desempenham um papel importante na proteção das plantas contra

herbívoros, reduzindo seu apetite por tais plantas. Eles também podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólen e sementes ou repelir insetos indesejáveis (BAKKALI et al., 2007).

Acredita-se que o termo "óleo essencial" derive do nome cunhado no século XVI pelo reformador suíço da medicina, Paracelsus von Hohenheim; ele nomeou o componente eficaz de uma droga como *Quinta essentia* (BURT, 2004). Estima-se que 3000 OEs sejam conhecidos, dos quais cerca de 300 são comercialmente importantes - destinados principalmente ao mercado de sabores e fragrâncias (VAN DE BRAAK e LEIJTEN, 1999).

Nas plantas, diferentes compostos orgânicos com estruturas de baixo peso molecular parecem não ter função nos processos básicos de crescimento e desenvolvimento dos vegetais sendo chamados de metabólitos secundários (GERSHENZON E DUDAREVA, 2007). Os metabólitos secundários provêm de precursores comuns do metabolismo primário, sendo este o metabolismo ligado com as funções de crescimento e desenvolvimento da planta, enquanto que as funções do metabolismo secundário dizem respeito às funções adaptativas das plantas e todos os aspectos de interações químicas com o meio ambiente sendo indispensáveis para a sobrevivência de uma população, porém dispensáveis para o crescimento do indivíduo (HARTMANN, 1996).

Os óleos essenciais são compostos complexos que podem conter aldeídos, compostos fenólicos e terpenos considerados seus principais constituintes divididos em hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (BAKKALI et al., 2007). São extraídos de várias plantas aromáticas geralmente localizadas em países de clima quente como os países mediterrânicos e de clima tropicais, onde representam uma parte importante da farmacopéia tradicional. Eles são líquidos, voláteis, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos com densidade geralmente menor que a da água. Podem ser sintetizados em botões, flores, folhas, caules, ramos, sementes, frutos, raízes, madeira ou casca e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares. Os óleos essenciais são caracterizados por conter dois ou três principais componentes em concentrações elevadas quando comparados a outros componentes presentes em quantidades vestigiais (BAKKALI et al., 2007). Em particular, a ação antimicrobiana dos óleos essenciais tem sido atribuída aos seus compostos fenólicos, que interagem com as proteínas das membranas celulares microbianas por meio de ligações de hidrogênio e interações iônicas ou hidrofóbicas causando

uma deformação estrutural e funcional. Outro mecanismo pode ser evidenciado pela alteração da permeabilidade da membrana celular e mitocondrial ocasionando a perda de macromoléculas (glicídeos, lipídeos e proteínas) e micronutrientes, e consequentemente, a viabilidade celular (GRIFFIN et al.,1999). Além disso, a inibição da síntese de ácidos nucleicos e da atividade enzimática promovidas pelos óleos essenciais causam a inativação celular microbiana (BAJPAI et al.,2011).

Existem vários métodos para a extração de óleos essenciais como a expressão, enfleurage (BURT, 2004), uso de dióxido de carbono líquido ou micro-ondas, destilação de baixa ou alta pressão empregando água fervente ou destilação á vapor, conforme mostrado na Figura 1 (BAKKALI et al., 2007) e também pela prensagem do pericarpo de frutos cítricos (BIZZO,2009). A extração do óleo essencial pode variar em qualidade, quantidade e composição de acordo com o clima, composição do solo, órgão, idade e fase do ciclo vegetativo da planta (BAKKALI et al.,2007).

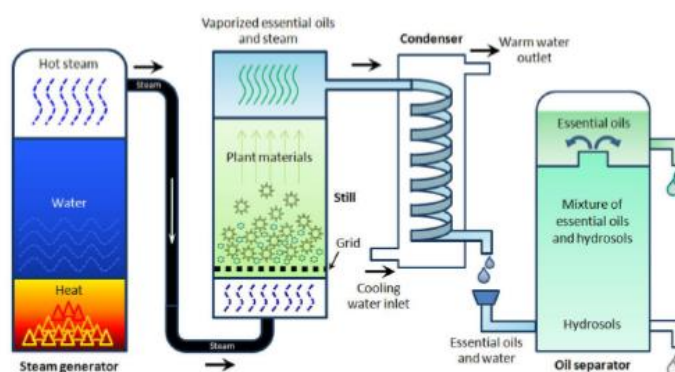


Figura 1. Destilação á vapor para obtenção de óleos essenciais. Neste processo somente o vapor passa através do material vegetal carregando o óleo essencial, esta mistura do óleo volatilizado e vapor é condensada então óleo essencial e água são captados e separados pela diferença de densidade. Fonte: Tongnuanchan e Benjakul, 2014.

O Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os quatro grandes produtores mundiais. A posição do Brasil deve-se aos óleos essenciais de cítricos, que são subprodutos da indústria de sucos. No passado, o país teve destaque como exportador de óleo essencial de pau-rosa, sassafrás e menta. Nos dois últimos casos, passou à condição de importador (BIZZO, 2009).

Segundo BURT (2004), já há alguns anos a sociedade ocidental vem passando por uma tendência de consumismo "verde", desejando menos aditivos alimentares sintéticos e produtos

com menor impacto sobre o meio ambiente. Além disso, a Organização Mundial da Saúde solicitou também uma redução mundial do consumo de sal, a fim de reduzir a incidência de doença cardiovascular (WHO, 2002b). Se o nível de sal nos alimentos processados for reduzido, é possível que outros aditivos sejam necessários para manter a segurança dos alimentos. Há assim, portanto, o escopo para novos métodos de tornar os alimentos seguros que tenham uma imagem natural ou "verde". Uma possibilidade, já mencionada, é exatamente o uso de óleos essenciais como aditivos antibacterianos (BURT, 2004).

2.2 Palmarosa (*Cymbopogon martinii*):

Os óleos essenciais extraídos das ervas aromáticas como o *Cymbopogon martinii* (palmarosa), *Cymbopogon winterianus* e *Cymbopogon citratus* tem um enorme valor comercial para aplicações tanto ambientais como agrícolas, alimentares e médicas, além de perfumaria e aromaterapia (SINHA et al., 2014)

Óleo essencial de importância comercial, o óleo de palmarosa tem ação antibacteriana e antifúngica atribuída principalmente ao seu componente majoritário, o geraniol. Este óleo é altamente valorizado na indústria de perfumaria como fonte de geraniol de alta qualidade (PRASHAR et al., 2003). Ele também é muito valorizado pelas indústrias de cosméticos por seu odor doce de rosas (THAKKER et al., 2016)

A Palmarosa é uma planta alta, áspera, perene e aromática, da família dos capins (Poaceae) (SMITH E RANA, 2015). O odor de seu óleo essencial traz um cheiro suave de rosa floral com nota herbal. É extraído de folhas e florações da planta. Seu composto majoritário e responsável por todas suas características antimicrobianas e organolépticas é o geraniol (70-80%). Abaixo do geraniol, o segundo composto mais abundante é o acetato de geraniol. Em menores quantidades o óleo é constituído também pelo linalol, (E)- β -ocimeno e β -cariofileno (MALLAVARAPU et al., 1998). O óleo essencial da Palmarosa é geralmente utilizado como matéria-prima de perfumaria em sabões e perfumes de odor de rosa (BURDOCK, 2010 e RAO, 2001) e preparação de produtos cosméticos e de higiene (DUBEY et al., 2000). Além disso, também é usado para aromatizar produtos de tabaco, alimentos e bebidas não alcoólicas (RAO et al., 1985). Na medicina popular é usado para os tratamentos de lombalgia, articulações rígidas, doenças de pele e para irritações cutâneas (RAO, 1999). Além de seu uso cosmético, é um anti-helmíntico eficaz (KUMARAN et al., 2003) e repelente de insetos à base de plantas (KUMAR et al., 2007; BARNARD e XUE, 2004). O óleo

comprovou sua eficácia contra as larvas do *Aedes aegypti*, vetor responsável pela dengue (TENNYSON et al., 2013). Além disso, o óleo essencial extraído do *Cymbopogon martinii* é tradicionalmente utilizado para o tratamento de epilepsia em crianças e em casos de febre na Índia (BHATT et al., 2012).

Frente as inúmeras propriedades promissoras, a Palmarosa pode se inserir dentro das novas tendências de mercado, incluindo o de cosmético e alimentício, que buscam minimizar a concentração de aditivos sintéticos ou substituí-los por substâncias naturais e na indústria farmacêutica com o objetivo de ajudar a resolver questões de resistência bacteriana. (ODRIOZOLA-SERRANO et al., 2014).

2.3 A pele:

O sistema tegumentar já foi considerado o maior órgão do corpo humano, com atribuições importantes para o funcionamento geral do organismo, pois constitui uma barreira entre o meio interno e o meio externo (GOMES E DAMAZIO, 2009).

A pele é uma fronteira ativa que se interpõe entre o organismo e o ambiente, constituindo cerca de 16% do peso corporal. É responsável por funções de defesa e regulatórias como a proteção contra agressões mecânicas, que é medida pela deformação reversível de sua estrutura; a limitação da absorção de substâncias (função barreira); é responsável pela absorção da radiação ultravioleta (UV) e síntese de vitamina D; controle da temperatura e estabilização da pressão sanguínea. No aspecto sensorial, é responsável pelas sensações de frio, calor e dor (RIBEIRO, 2010).

A análise histológica mostra que a pele é dividida em duas camadas básicas: a epiderme e derme; sendo encontrada logo abaixo da derme uma camada formada por tecido adiposo, a hipoderme, considerada uma camada subcutânea (Figura 2) (PAILLER-MATTEI et al., 2007; RIBEIRO, 2010).

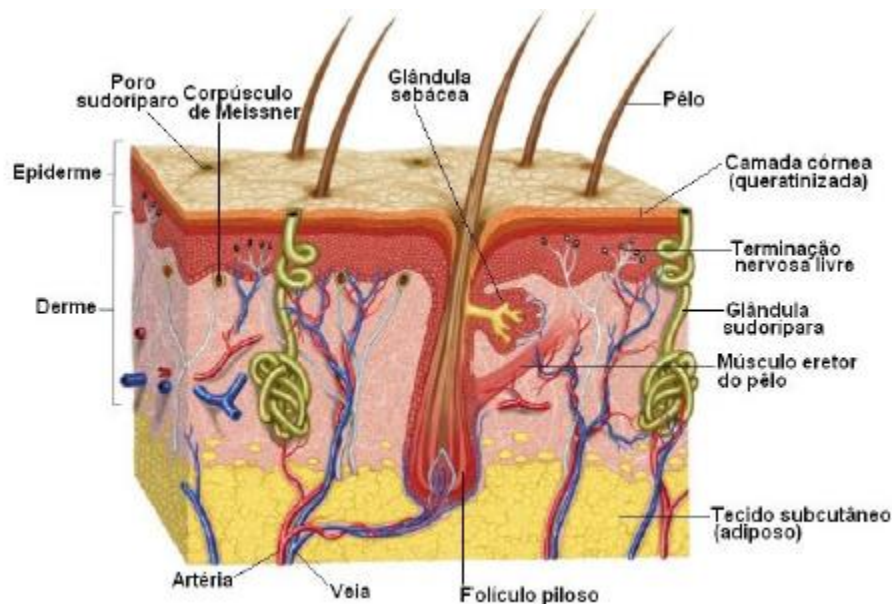


Figura 2. Representação histológica das camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme (camada subcutânea). Fonte: Pereira, 2011

A epiderme é uma camada de epitélio pavimentoso estratificado e avascular, isto é, não possui circulação sanguínea e linfática. A espessura e a estrutura da epiderme variam de acordo com a área estudada, sendo mais espessa na palma das mãos, na planta dos pés e em algumas articulações, como joelhos e cotovelos, que podem atingir até 1,5 mm. Já, na face de espessura é em torno de 0,06 mm (LEONARDI, 2008; GOMES E DAMAZIO, 2009). A epiderme é constituída por várias camadas que podem ser denominadas também de estratos. São elas (da região mais externa para a mais interna): camada córnea, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal. Suas células principais são os queratinócitos que são células epiteliais estratificadas, que sofrem diferenciação à medida que migram da camada basal até a camada mais superficial da pele, quando descamam em várias camadas de células queratinizadas, anucleadas e sem organelas, chamadas de corneócitos. Para que todo esse evento ocorra são necessários aproximadamente 30 dias (PEREIRA, 2011).

A derme consiste em um tecido resistente e elástico que proporciona resistência física ao corpo frente às agressões mecânicas, fornece nutrientes à epiderme e abriga os apêndices cutâneos, vasos sanguíneos e linfáticos. Entendem-se como apêndices cutâneos glândulas sudoríparas, sebáceas e folículos pilosos. A derme, constituída por fibras de colágeno e elastina, é dividida em duas partes: a derme papilar que se encontra em contato direto com a epiderme e a derme reticular, localizada abaixo da derme papilar. As fibras colágenas conferem maior resistência à pele, formando uma rede que sustenta outras estruturas como

pelos, unhas, glândulas sudoríparas e sebáceas. As fibras elásticas permitem a deformação da pele, que retorna ao estado original quando suspensa a tensão aplicada. Os vasos sanguíneos nutrem e regulam a temperatura corporal através da alternância contínua de mecanismos de vasodilatação e vasoconstrição dos capilares em função da situação ambiental. As sensações tais como alteração na temperatura e pressão, tato e dor são detectados por nervos específicos presentes na derme, que recebem a todo instante, diversos tipos de estímulos do ambiente transmitindo- os ao cérebro, onde serão traduzidos em sensações. A espessura da derme é maior que 800 µm e menor que 1500 µm (RIBEIRO, 2010).

A hipoderme, camada subepidérmica, é formada por tecido conjuntivo frouxo, altamente vascularizado e células de gordura denominadas adipócitos, tendo espessura bastante variável (LEONARDI, 2008). Esta camada apoia e une a epiderme e a derme ao restante do corpo e permite que as duas primeiras camadas deslizem livremente sobre as outras estruturas do organismo. Além disso, a hipoderme mantém a temperatura corporal, acumula energia para o desempenho das funções biológicas, protege o organismo contra agressões mecânicas e facilita a mobilidade da pele em relação às estruturas subjacentes (PEREIRA, 2011).

O chamado pH fisiológico da pele varia entre 4,5 e 6,0, dependendo da região do corpo ou da idade, e contribui para que ocorra proteção bactericida e fungicida na superfície do corpo (RASCHE, 2014).

2.3.1 Microbiota da pele:

A pele não é apenas uma barreira eficaz entre o organismo e o ambiente, mas é também um ecossistema composto de diferentes habitats ricos em invaginações, cavidades e nichos. Os micro-organismos que habitam as camadas superficiais da pele formam a chamada "microbiota da pele", incluindo bactérias, vírus, archaea e fungos (BAVIERA et al,2014). Cada centímetro quadrado de pele contém até 1 bilhão de bactérias, incluindo folículos capilares e glândulas sebáceas (GRICE et al, 2008). Nas áreas mais pobres, pode se encontrar em torno de 10^4 bactérias por cm^2 . Estas comunidades microbianas estão intimamente envolvidas no bem-estar humano e no desenvolvimento de doenças (CHILLER et al,2001; FREDRICKS,2001).

Grupos específicos de micro-organismos colonizam nichos anatômicos distintos do corpo humano como pele, nariz, boca e vagina. Eles estão constantemente presentes nas superfícies corporais e podem impedir a colonização por patógenos e o possível

desenvolvimento de doenças, restaurando os nichos ecológicos da pele. Os micro-organismos comensais estão em simbiose: eles contribuem para a saúde humana e bem-estar, através da produção de moléculas de defesa ou antibióticos naturais. A microbiota transitória da pele pode colonizar temporariamente a superfície, mas estes micro-organismos são incapazes de permanecer no corpo durante um longo período de tempo devido à concorrência com os micróbios residentes. Eles persistem sobre a pele por algumas horas ou dias e não são patogênicos em condições normais (respostas imunes normais, função de barreira da pele intacta) (BAVIERA et al, 2014).

A microbiota da pele humana é composta principalmente por bactérias pertencentes aos gêneros *Staphylococcus*, *Cutibacterium* (ou *Propionibacterium*), *Micrococcus* e *Corynebacterium* (ANDRADE et al., 2018), mas de forma geral, há grandes comunidades microbianas que residem em diferentes locais do corpo, sendo concentrados especialmente nas áreas mais úmidas e quentes como axilas e períneo. São eles: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*. A composição das comunidades microbianas cutâneas evolui ao longo da vida, mostrando uma crescente diversidade com idade. A microbiota da pele do bebê é diferente do adulto. Embora a colonização precoce seja dominada pelos estafilococos (o estrato córneo de uma criança é relativamente melhor hidratada do que a de um adulto), seu declínio significativo contribui para o aumento da uniformidade da população até o primeiro ano de vida. Em contraste com os adultos, o filo *Firmicutes* predomina na pele infantil (BAVIERA et al, 2014; CAPONE et al., 2011).

Áreas com alta densidade de glândulas sebáceas, como o rosto, o peito e as costas, permitem o crescimento de micro-organismos lipofílicos. Na verdade, as glândulas sebáceas estão próximas do topo dos folículos pilosos e produzem uma substância oleosa e cerosa chamada de sebo, que promove o crescimento de anaeróbios facultativos como o *Cutibacterium acnes* que, pela hidrólise dos triglicerídeos presentes no sebo, libera ácidos graxos livres, contribuindo para a manutenção do pH epidérmico ácido folículos capilares e glândulas sebáceas representam um ambiente anóxico que hospeda micro-organismos anaeróbicos (BAVIERA et al, 2014).

O *Staphylococcus epidermidis* também é uma bactéria da microbiota da pele e representa mais de 90% das bactérias residentes da microbiota aeróbica da pele. É uma bactéria Gram-positiva, mas também é um patógeno oportunista que explora

imunodeficiências nas defesas inatas do hospedeiro e causa infecções nosocomiais associadas a cateteres e outros corpos estranhos (SHEIKHOLESLAMI et al., 2016)

Anteriormente *S. epidermidis* era considerado apenas um micro-organismo comensal inócuo da pele humana. Atualmente é visto como um importante patógeno oportunista, responsável por infecções com taxas tão altas quanto aquelas mostradas para *S. aureus*. Em particular, *S. epidermidis* representa a fonte mais comum de infecções em dispositivos médicos internos. Isso provavelmente decorre do fato de *S. epidermidis* ser um colonizador permanente e onipresente da pele humana o que leva à alta probabilidade resultante de contaminação em dispositivo durante a inserção. Embora as infecções por *S. epidermidis* raramente se desenvolvam em doenças potencialmente fatais, sua frequência e o fato de serem difíceis de tratar representam problemas para os sistemas de saúde (OTTO, 2009).

Muitas cepas de *S. epidermidis* produzem lantibióticos ou os chamados peptídeos antibacterianos contendo lantionina, também conhecida como bacteriocina, que dessa forma faz com que a colonização de superfícies corporais (especialmente no nariz) por *S. epidermidis* atrapalhe o estabelecimento de outras bactérias como o *S. aureus*. A epiderme hospedeira que permite o crescimento de *S. epidermidis* pode possuir um nível adicional de proteção contra certos patógenos comuns, tornando a relação hospedeiro-bactéria uma relação de mutualismo (BAVIERA et al, 2014).

2.3.2 *Cutibacterium acnes*:

A acne vulgar é uma doença inflamatória crônica da unidade pilossebácea. A patogênese da acne é multifatorial e inclui o aumento da seborreia, hiperqueratinização ductal epidérmica, hipercolonização por *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) e inflamação (DESSINIOTI e KATSAMBAS, 2017).

Sua antiga denominação, *Propionibacterium acnes*, foi dada por fazer parte do gênero *Propionibacterium* descrito por Orla-Jensen em 1909 e constituído por espécies amplamente conhecidas por produzirem ácido propiônico como produto final da fermentação. As mais notáveis são as espécies *Propionibacterium freudenreichii*, pela sua valiosa contribuição para a produção dos queijos suíços, *P. acidipropionici* por sua ação no metabolismo do rúmen bovino e finalmente, o *P. acne*, notório por suas implicações na acne vulgar e capacidade de contaminar amostras humanas (SHOLZ e KILIAN, 2016). *C. acnes* também é considerado um patógeno oportunista em infecções relacionadas a procedimentos cirúrgicos, pela

introdução de corpos estranhos, septicemia e em infecções associadas aos implantes (articulações protéticas, fibrose mamária, infecções relacionadas a dispositivos cardiovasculares ou osteomielite espinhal) (CEBRIÁN et al., 2018).

Porém, em 2016 Sholz e Kilian, propuseram uma nova classificação para o gênero *Propionibacterium* da família *Propionibacteriaceae*. Tradicionalmente, as espécies desse gênero eram agrupadas como propionibactérias clássicas ou cutâneas, baseadas em características fenotípicas e do local de isolamento. Eles reavaliaram a taxonomia da família e elucidaram o parentesco interespecies através da comparação de 162 sequências públicas de genomas completos que representavam espécies da família *Propionibacteriaceae*. Discrepâncias substanciais foram notadas quando análises de alta resolução para o genoma do core foram realizadas e isso então, fez com que os autores propusessem três novos gêneros: *Acidipropionibacterium*, *Cutibacterium* e *Pseudopropionibacterium*. Além disso, análises filogenéticas, conteúdo de DNA G + C, composição de peptidoglicanos e padrões de perdas genéticas e aquisições nas propionibactérias cutâneas durante sua adaptação ao hospedeiro humano corroboraram com essa nova classificação.

A bactéria da pele humana *C. acnes* é um bacilo anaeróbico Gram-positivo, não formador de esporos, que reside principalmente nas porções micro-aerofílicas profundas dos folículos sebáceos saudáveis em contato com queratinócitos foliculares e em células na região proximal do ducto sebáceo (DESSINIOTI e KATSAMBAS, 2017). Possui crescimento relativamente lento, sendo um comensal sobre a pele que em contato com os poros epiteliais promove a inflamação dos folículos pilosos provocando lesões vulgarmente conhecidas como "espinhas" (BHATIA et al., 2004). Além disso, *C. acnes* é um dos principais habitantes da pele humana adulta saudável, e geralmente é considerado um comensal inofensivo (BRUGGERMANN et al., 2004). Na pele do rosto e nas costas, aproximadamente 50% da microbiota total é representado por essa bactéria (ANDRADE et al., 2018).

C. acnes pode modular a diferenciação de queratinócitos causando uma hiperqueratinização do folículo, bem como sua reduzida descamação e aumento da inflamação local. Tem papel fundamental no desenvolvimento de lesões inflamatórias da acne, assim como a formação de microcomedões nos estágios iniciais da acne, que podem evoluir para comedões fechados ou abertos e lesões inflamatórias, tais como pápulas, pústulas, nódulos e cistos, (KIM, 2005). No entanto, tem sido relacionada a lipogênese e produção de sebo. *C. acnes* interage com marcadores de imunidade inata, como receptores

toll-like, peptídeos antimicrobianos, receptores ativos de proteases, de metaloproteinases e regulação positiva da secreção de diferentes citocinas pró-inflamatórias como interleucina [IL] -1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, fator de necrose tumoral α ou macrófagos granulocíticos com fator estimulante de colônias. Interage também com queratinócitos humanos, sebócitos, ou células mononucleares do sangue periférico. Além disso, *C. acnes* pode promover a formação de comedões através da produção de IL-1 α e possivelmente induzir comedogênese por via do receptor (IGF-1R) de insulina para fator de crescimento 1 (IGF-1) (DESSINIOTI e KATSAMBAS, 2017).

A contradição entre o papel como comensal da pele e o comportamento mais patogênico pode ser parcialmente explicada pelas propriedades específicas da linhagem onde diferentes cepas de *C. acnes* contribuem de forma diferente para a saúde e a doença. As cepas de *C. acnes* podem ser divididas principalmente em três tipos filogenéticos: IA, IB, II e III, de acordo com a comparação de sequências dos genes *recA* e *tly*. Mais recentemente, outras discriminações foram auxiliadas por vários esquemas de tipagem de sequência multilocus (MLST) e protocolos de PCR baseados em sequências repetitivas. O subtipo I de *C. acnes*, mais especificamente denominado I-1a, está predominantemente associado a acne moderada a grave. Em contraste, *C. acnes* tipo II é relatada como o tipo mais prevalente em estudos anteriores de espécimes prostáticos obtidos de pacientes com câncer de próstata (DAVIDSSON et al.,2016). *C. acnes* tipo III é considerada a cepa mais virulenta entre os três tipos e esta relacionada à hipomelanose macular progressiva (HMP) que é uma doença da pele caracterizada por máculas hipopigmentadas que atingem jovens adultos (PETERSON et al.,2016). É uma dermatose comum, clinicamente, caracteriza-se por máculas numulares mal definidas, hipopigmentadas, confluentes, de localização simétrica, em áreas seborreicas, geralmente no tronco posterior e anterior e, mais raramente, no pescoço e partes proximais das extremidades. As lesões são assintomáticas e não há precedentes de lesão inflamatória (DUARTE et al.,2010).

A acne é uma doença de pele comum, que afeta até 80% de todos os adolescentes nos Estados Unidos e que embora não seja mortal, é uma doença com um profundo impacto sobre a qualidade de vida dos jovens. A acne pode persistir por anos e é conhecida por ter sérios efeitos psicossociais, como diminuição da auto-estima, depressão, frustração e retraimento social. Estima-se que quase 20% de todas as visitas aos dermatologistas estão relacionadas ao tratamento da acne. A acne frequentemente começa durante mudanças nos níveis hormonais

em pré-adolescentes; no entanto, também é muito comum em condição de início da idade adulta, geralmente associada à flutuação hormonal durante o ciclo menstrual e na gravidez. (BRUGGERMANN et al.,2004; BHATIA et al.,2004).

Essa bactéria também é encontrada em todo o trato gastrointestinal em humanos e de muitos outros animais. *C. acnes* está cada vez mais associada a endocardite, infecções intravasculares e do sistema nervoso central, endoftalmite, infecções associadas aos dispositivos protéticos, patologias da próstata como o câncer, sarcoidose; cálculos biliares de colesterol; alveolite alérgica; angite pulmonar; sinovite pustulose, hiperostose e osteíte (BRUGGERMANN et al.,2004; PERRY e LAMBERT, 2011).

2.4 Resistência Bacteriana e Produtos Naturais:

Doenças infecciosas representam um importante problema de saúde pública e têm sido alvo de muitas pesquisas. Apesar do desenvolvimento de diferentes antimicrobianos, o problema da resistência microbiana evidencia a necessidade pela busca por novas opções terapêuticas (GHOLAM-REZA et al.,2017).

Antimicrobianos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de micro-organismos, como as bactérias, sendo classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003).

A existência dos micro-organismos começou a ser evidenciada após experimentos realizados por Louis Pasteur, um químico francês, que demonstrou que algumas linhagens microbianas eram importantes para processos fermentativos e também, que eram de ampla distribuição no ambiente. Entretanto, somente muito tempo depois desta descoberta é que o microbiologista Alexander Fleming observou, pela primeira vez, que algumas substâncias produzidas por um fungo eram capazes de inibir o crescimento bacteriano, descrevendo o primeiro antibiótico da história: a penicilina (PATRICK, 2005).

A partir daí, Paul Ehrlich, conhecido como o pai da quimioterapia, foi responsável pelos conceitos primários de que uma substância química poderia interferir com a proliferação de micro-organismos em concentrações toleráveis pelo hospedeiro. Porém casos de resistência surgiram em poucos anos (PATRICK, 2005).

Entre os anos 1940-1960 vários antibióticos foram descobertos através de triagens de produtos naturais microbianos. E no período de 1980-2000, as principais ferramentas

utilizadas para a busca de novos antibióticos foram a genômica e as triagens de coleções de compostos. Porém, houve uma redução dramática na identificação de novos protótipos de antibióticos, ao mesmo tempo em que ocorreu um aumento na incidência de resistência. (GUIMARÃES et al.,2010).

O termo resistente se refere àqueles micro-organismos que não são inibidos pelas concentrações de antimicrobianos habitualmente alcançados no sangue e tecidos ou que apresentam mecanismos de resistência específicos para o agente químico utilizado e que não geram uma adequada resposta clínica quando usado como tratamento (RODRIGUEZ et al.,2000). Uma ampla variedade de micro-organismos é listada como resistente a vários medicamentos antibacterianos tanto em ambientes hospitalares quanto na comunidade, uma vez que estes têm respondido aos tratamentos antimicrobianos com o aumento da complexidade de seus mecanismos de resistência. (TENOVER, 2006)

O surgimento de cepas resistentes é multifatorial, podendo ocorrer devido ao uso incorreto de antimicrobianos, o que gera a chamada pressão pela seleção (TOHIDPOUR et al.,2010), ou seja, cepas resistentes sobrevivem ao tratamento quando são utilizados antimicrobianos de amplo espectro no lugar de drogas de espectro restrito (BARBOSA e LEVY, 2000). A resistência bacteriana também pode ser natural, pois há bactérias naturalmente resistentes a certos antimicrobianos, como por exemplo, os *Enterococcus* que são naturalmente resistentes a qualquer cefalosporina, o que é conhecido como resistência intrínseca (ANTONIO et al.,2009).

A resistência bacteriana pode ser transferida por mecanismos diversos, podendo estabelecer-se entre microrganismos de uma mesma população ou de diferentes populações, como da microbiota animal para humana e vice-versa (MOTA et al., 2005)..

O uso de drogas antimicrobianas tanto em animais quanto no homem determina aumento da resistência antimicrobiana das bactérias. Somente 50% dos antimicrobianos produzidos são utilizados na terapia humana, a outra metade é empregada na profilaxia, tratamento ou como promotores de crescimento animal e no extermínio de pragas na agricultura. A alimentação animal é incrementada com suplementos e antimicrobianos para reduzir os riscos de epidemias em criações animais. Esta prática também exerce uma pressão seletiva para genes resistentes a antimicrobianos, os quais levam à emergência de bactérias resistentes associadas com animais de produção e alimentos (MOTA et al., 2005).

Bactérias multirresistentes podem ser consequência ainda da prescrição e administração inadequada de antimicrobianos o que compromete a resposta clínica do paciente e aumenta o tempo e os custos com internação. Em alguns países, antimicrobianos são utilizados sem receita médica em até dois terços das ocasiões. Mesmo quando formalmente prescritos, sua indicação pode ser desnecessária em até 50% dos casos. Diversos fatores contribuem nesse consumo desmedido, como a expectativa do paciente em receber tratamento eficaz, o tempo cada vez mais exíguo das consultas médicas e pressões da indústria farmacêutica. Além disso, talvez por falta de informação, muitos profissionais encaram o risco de indução de resistência como algo essencialmente teórico ou pouco provável. O emprego ambulatorial de antimicrobianos se concentra em 80% do consumo humano (ZIMERMAN, 2010).

A RDC 44/2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamentou que os estabelecimentos que comercializam o produto devem "manter à disposição das autoridades sanitárias a documentação fiscal referente à compra, venda, transferência ou devolução das substâncias antimicrobianas bem como dos medicamentos que as contenham". A resolução diz ainda que "toda documentação relativa à movimentação de entradas, saídas ou perdas de antimicrobianos deverá permanecer arquivada no estabelecimento e à disposição das autoridades sanitárias" por no mínimo cinco anos. Essa é uma forma de tentar controlar a venda indiscriminada de antimicrobianos (ZIMERMAN, 2010).

A resistência bacteriana surge porque o genoma é extremamente versátil, embora pequeno. As atividades essenciais de uma bactéria são codificadas pelo cromossomo e as não-essenciais, como a defesa contra drogas e a transferência gênica, que levam à recombinação, são codificadas por elementos móveis, que não fazem parte do cromossomo (exemplos são plasmídeos e transposons). A resistência cromossômica pode surgir por mutação espontânea dentro da própria bactéria, que pode ser a simples troca de um nucleotídeo, desde que não torne a bactéria inviável. A bactéria pode adquirir, após a mutação, resistência cromossômica pela alteração ou superprodução do alvo, mas também, por mudanças na síntese de proteínas ligadas à permeabilidade do seu envoltório, alterando a entrada e o acúmulo da droga dentro da célula, dificultando o encontro droga-alvo (MOTA, 2005).

Os genes de resistência quase sempre fazem parte do DNA de plasmídeos extra-cromossômicos, que podem ser transferidos entre micro-organismos. Alguns genes de resistência fazem parte de unidades de DNA denominadas transposons que se movem entre

cromossomos e plasmídeos transmissíveis. O DNA externo pode ser adquirido mediante transformação, resultando em trocas de DNA cromossômico entre espécies, com subsequente recombinação interespecies. Os principais mecanismos de resistência são: alteração da permeabilidade, do sítio de ação do antimicrobiano, bomba de efluxo e mecanismos enzimáticos (ANVISA, 2018).

Compostos naturais obtidos de plantas podem representar terapias alternativas, pois muitos possuem propriedades terapêuticas excelentes e não causam resistência bacteriana (MITIC-CULAFIC et al.,2005). O uso de compostos à base de plantas aumentou nos últimos anos e efeitos antimicrobianos foram confirmados para muitos compostos naturais. (TAHERIKALANI et al.,2016)

2.4.1 *C. acnes* e Resistencia Bacteriana:

A prevalência mundial de *C. acnes* resistente a antimicrobianos está aumentando com taxas que variam em diferentes partes do mundo. A razão para a diferença nos padrões de resistência mundiais não é clara, embora possa ser atribuída a prescrição de diferentes antimicrobianos de uso oral junto de agentes tópicos para acne (como retinóicos ou peróxido de benzoíla) ou mesmo a presença de diferentes populações de *C. acnes*. O uso de antimicrobianos tópicos e sistêmicos a longo prazo para a acne e a disponibilidade de compra de certos fármacos sem receita médica, aqueles chamados *over-the-counter*, também contribuem para o surgimento de cepas resistentes. A resistência cruzada de *C. acnes* à clindamicina e eritromicina foi relatada pela primeira vez em 1979, e a resistência às tetraciclina foi documentada pela primeira vez em 1983 nos Estados Unidos, quando pacientes passaram a responder mal ao tratamento com antimicrobianos orais (DESSINIOTTI e KATSAMBAS, 2017).

A resistência de *C. acnes* aos antimicrobianos é predominantemente mediada por mutações cromossômicas (MENDOZA et al., 2013) A resistência cruzada entre eritromicina e clindamicina tem sido associada a mutações pontuais nos genes que codificam a subunidade 23S do ribossomo. RNA, que dá resistência aos antimicrobianos macrolídeo-lincosamida (clindamicina) -streptogramina B (MLS) (ROSS et al.,1997; GONZALEZ et al.,2010). A resistência à tetraciclina é frequentemente associada a uma mutação na subunidade ribossômica RNAr 16S da subunidade menor do ribossomo (ROSS et al.,1998), está relacionada a acne filotipo IA-2 (McDOWELL et al.,2012). Cepas do filotipo IA-2 e algumas

de IA-1 representam quase todas as cepas resistentes a tetraciclina, eritromicina e clindamicina (McDOWELL et al.,2012). A resistência a antimicrobianos MLS em *C. acnes* é também mediada por um transposon adquirido de *Corynebacterium*, portador do gene de resistência erm (X). O transposon contendo o gene de resistência erm (X) é responsável por 8,9% das cepas MLS resistentes observadas em todos os seis países da união Europeia (ROSS et al.,2002).

Um estudo de 115 pacientes com acne no Egito relatou que cepas de *C. acnes* foram isoladas em 98 pacientes, detectando-se resistência à clindamicina em 65 isolados e para a eritromicina, 48 isolados. Não houve associação da resistência à *C. acnes* com acne adulta ou a duração da acne; no entanto, houve um pequeno número de pacientes com acne com 20 anos ou mais (n = 48) incluídos neste estudo (FATTAH e DARWISH,2012).

A presença de biofilme bacteriano pode ter um papel fundamental na resistência antimicrobiana. Este complexo protetor chamado substância polimérica extracelular (EPS) é produzido pela bactéria e as protege dos sistemas de defesas do hospedeiro e terapias com antimicrobianos tópicos ou sistêmicos limitando as concentrações antimicrobianas eficazes dentro do microambiente do biofilme (DESSINIOTTI e KATSAMBAS, 2017). Biofilme de *C. acnes* foi mostrado um estudo caso-controle de 38 pacientes com acne, mostrando um maior número de bactérias em macro-colônias/biofilmes nos folículos sebáceos de pacientes com acne em comparação com amostras controle (JAHNS et al.,2012)

2.5 Cosméticos, Dermocosméticos e Emulsões:

A palavra “cosmético” vem do grego *kosmêticos*, relativo a adorno, prática ou habilidade em adornar (RIBEIRO, 2010). Pode-se dizer que o uso de cosméticos remonta há pelo menos 30.000 anos, haja vista que os homens da pré-história já faziam gravações em rochas e cavernas e pintavam o próprio corpo. A decoração do corpo estava presente também nos rituais tribais praticados pelos aborígenes, assim como a pintura de guerra. A religião era, também, uma razão para o uso desses produtos: cerimônias religiosas frequentemente empregavam resinas e unguentos de perfumes agradáveis. A queima de incenso deu origem à palavra perfume, que no latim quer dizer "através da fumaça". Por outro lado os egípcios, através dos relatos da história, foram os primeiros usuários de cosméticos e produtos de toucador, em larga escala. Um exemplo disso foi o verde de malaquita usado como sombra para os olhos e o extrato vegetal de henna para pintar os

cabelos. Já na era romana, por volta do ano 180 d.C., um médico grego chamado Claudius Galen realizou sua própria pesquisa científica na manipulação de produtos cosméticos, iniciando a era galênica dos produtos químico-farmacêuticos (LEONARDI et al,2008).

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA) cosméticos são produtos que quando aplicados no corpo humano, limpam, embelezam, promovem atratividade ou modificam a aparência da pele e cabelos ou do corpo, sem afetar sua estrutura ou função. Segundo a RDC N^o211 de 14 de julho de 2005, da ANVISA produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado. Esses produtos podem ser classificados em grau I ou grau II. Os produtos de grau I são aqueles que se caracterizam por possuírem propriedades básicas ou elementares, cuja comprovação não seja inicialmente necessária e não requerem informações detalhadas quanto ao seu modo de usar e suas restrições de uso, devido às características intrínsecas do produto. Já os produtos de grau II possuem indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso. Aqui se encaixam produtos para tratamento de acne, rugas, protetor solar, maquiagem com fotoprotetor, clareador de pele, esfoliante, “peeling” químico, entre outros. Os produtos de grau II podem ser chamados de dermocosméticos ou cosmecêuticos (ANVISA, 2005).

No Brasil e em outros países é comum quando um produto cosmético afeta de maneira considerável a funcionalidade da pele, são os chamados cosmecêuticos, termo criado por Kligman há cerca de 30 anos e que consiste na mistura das palavras cosmético e farmacêutico. Todavia, o produto final é primariamente um cosmético, mas com promessa de benefícios como um produto farmacêutico. Os cosmecêuticos tem mecanismo de ação conhecido e eficácia comprovada. Apesar da palavra ser frequentemente empregada, nos Estados Unidos, por exemplo, onde o FDA enquadra os produtos tópicos em medicamentos cosméticos ou *Over the Counter* (RIBEIRO,2008). São produtos que atuam em camadas mais profundas da pele e são capazes de mudar fisiologicamente algumas ações, melhorando o aspecto físico da mesma (GONZÁLEZ E BAMIO, 2002). No Brasil, os cosmecêuticos são regulamentados dentro de portarias da ANVISA que falam sobre cosméticos.

No dia a dia de uma farmácia magistral, as emulsões tópicas são as mais comumente preparadas, sendo que os cremes (cosméticos de uso externo) são muito utilizados como bases para a incorporação de diversos fármacos, produtos naturais e com as mais variadas aplicabilidades (ZANON, 2010).

Segundo a Farmacopéia Brasileira de 2012, uma emulsão é constituída de um sistema de duas fases com pelo menos dois líquidos imiscíveis e no qual um dos líquidos é disperso na forma de pequenas gotas (fase interna ou dispersa) no outro líquido (fase externa, contínua ou dispersante). De acordo com a hidrofília ou lipofília da fase dispersante, esses sistemas classificam-se em óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O). Essas fases são estabilizadas por meio de um ou mais agentes emulsificantes ou surfactantes. Estes são substâncias capazes de minimizar a energia livre no limite entre as fases, diminuindo tensão interfacial do sistema e formar um filme, ao redor dos glóbulos da fase dispersa, com propriedades estéricas e eletrostáticas, estabilizando o sistema. Para SALAGER (2000), as moléculas de surfactante apresentam um comportamento bastante peculiar, que é inerente a sua estrutura. Primeiro porque elas tendem a se adsorver nas interfaces, onde podem realizar sua dupla afinidade colocando a parte polar em contato com a fase aquosa e a parte apolar com a fase oleosa ou o ar. E segundo porque elas reduzem a incompatibilidade com o solvente através de um tipo específico de agregados: as chamadas micelas. Micelas são agregados coloidais que se formam acima de uma concentração específica de surfactante, a concentração micelar crítica (CMC). Numa micela normal os grupos hidrofílicos estão voltados para a fase contínua aquosa e as caudas hidrofóbicas estão voltadas para a região interna da micela, onde se localiza a parte oleosa (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2012).

As moléculas de surfactante adsorvidas nas novas interfaces geradas impedem a coalescência de duas maneiras. Primeiramente, a presença de surfactante dá origem a forças repulsivas - que podem ser de origem eletrostática, estérica ou de oscilação estrutural - entre as gotas, provocando uma estabilidade ao sistema. Além disso, a camada de surfactante adsorvida, diminui (ou até mesmo remove completamente) a mobilidade tangencial das superfícies das gotas, o que desacelera as colisões entre elas; processo esse conhecido como estabilização cinética. Este último está relacionado ao efeito de Marangoni, ou seja, ao aparecimento de gradientes de adsorção e tensão interfacial ao longo das superfícies de duas gotas em colisão. Tais gradientes permitem que as gotas sofram deformação sem se

romperem, o que nos leva a concluir que as monocamadas de surfactante formadas aumentam a elasticidade das novas interfaces (ALMEIDA, 2014).

Os tensoativos possuem dupla função que são reduzir a tensão interfacial e estabilizar o sistema prevenindo fenômenos de instabilidade que poderão causar a separação das fases do sistema. Os principais fenômenos de instabilidade observados em emulsões são floculação, cremação e coalescência (SCHULLER, ROMANOWSKI, 1998).

Na Figura 3 são representados esses fenômenos. A floculação é um fenômeno que pode ser definido como uma adesão mútua dos glóbulos da fase dispersa, formando uma rede tridimensional, porém, os glóbulos permanecem com a estrutura do filme interfacial inalterado, e uma simples agitação pode reverter o processo. O processo de cremação ocorre quando há diferença entre as densidades da fase dispersa e dispersante da emulsão, provocando a separação das fases. Quando a fase dispersa é menos densa do que a fase dispersante, os glóbulos da emulsão formarão um creme na região superior da amostra, o inverso ocorre quando a fase dispersante é menos densa que a fase dispersa, este processo de instabilidade é reversível, por simples agitação do sistema. A coalescência é um processo irreversível e, ocorre quando dois glóbulos alcançam proximidade suficiente, têm a estrutura de suas interfaces comprometidas e, perdem a individualidade tornando-se um único glóbulo (SCHULLER; ROMANOWSKI, 1998; MORRISON; ROSS, 2002). Dependendo do tamanho do glóbulo, emulsões podem ser classificadas em microemulsões, mini (nanoemulsões) e macroemulsões (ZANIN et al., 2002; JAFARI et al., 2008). A produção de nanocosméticos, especificamente falando, está mundialmente inserida na indústria de cosméticos convencionais, constituindo se em uma linha de produtos diferenciados de base nanotecnológica, sendo geralmente classificado como um setor específico da indústria química juntamente com os produtos de higiene pessoal e perfumaria (BARIL et al, 2012).

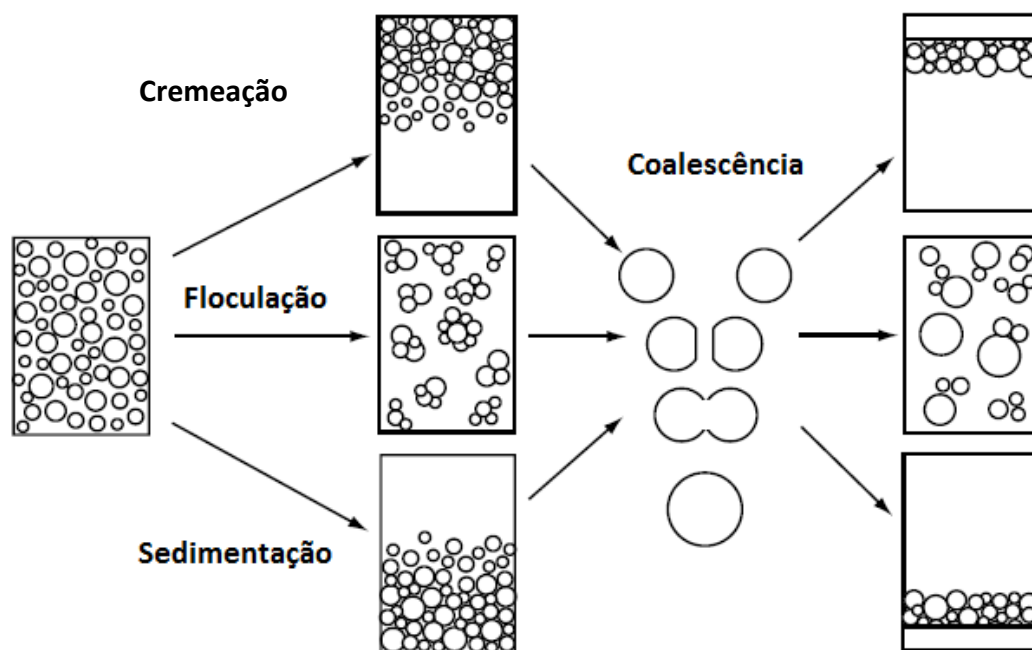


Figura 3. Mecanismos de desestabilização de emulsões. Note que processos diferentes podem ocorrer simultaneamente. Fonte: Almeida, 2014

Para se adequar aos novos contextos, a Cosmetologia tem extrapolado sua proposta inicial de forma a assimilar tecnologias conquistadas por diferentes áreas do conhecimento humano, como a Bioquímica no seu aspecto molecular-metabólico, a Química Orgânica aplicada à descoberta e purificação de isômeros fito-ativos possuidores de performances especiais, a Biologia Molecular no que diz respeito aos efeitos de determinados compostos na sinalização celular e, para possibilitar estudos genômicos verdadeiramente inferenciais, quanto à atividade cutânea de compostos naturais (LEONARDI et al., 2008). Durante as últimas décadas, ocorreu uma explosão de informações e avanços científicos relacionados à pesquisa cutânea, que tem beneficiado tanto os médicos dermatologistas como os profissionais que trabalham com o desenvolvimento de produtos cosméticos (LEONARDI et al., 2002).

2.6 Sistemas Nanoestruturados e Nanoemulsões:

A nanotecnologia é focada na caracterização, fabricação, manipulação e aplicação de estruturas biológicas e não biológicas (SAHOO et al., 2007) na escala nanométrica. O prefixo “nano” está relacionado a uma escala de medida em que um nanômetro representa um

bilionésimo do metro ou um milionésimo do milímetro. Estruturas nessa escala apresentam propriedades funcionais únicas não encontradas na escala macro (CHAU et al., 2007). Os nanocompósitos ou sistemas nanoestruturados são materiais híbridos, nos quais pelo menos um de seus componentes tem dimensões nanométricas ASSIS et al., 2012).

A principal razão para as diferenças no comportamento entre materiais compostos e nanocompósitos está relacionada com a elevada área superficial destes últimos, resultando em intensa interação entre a matriz na qual estão inseridos e as nanopartículas (ASSIS et al., 2012). Trata-se de um campo científico multidisciplinar que se aplica a praticamente todos os setores da pesquisa, da engenharia de materiais e processos e de mercado. Essas partículas são extensivamente investigadas por promoverem muitas vantagens em relação às formulações tradicionais. A nanotecnologia aplicada à cosmética refere-se à utilização de pequenas partículas contendo princípios ativos que são capazes de penetrar nas camadas mais profundas da pele, potencializando os efeitos do produto (BARIL et al., 2012).

A aplicação da nanotecnologia em alimentos é nova em comparação a área biomédica e as indústrias de tecnologia de informação, nas quais a nanotecnologia já é utilizada na fabricação de materiais. No entanto, já existem inúmeras oportunidades que podem ser exploradas, como a elaboração de produtos com características funcionais e nutracêuticas, o desenvolvimento de processos e embalagens inteligentes (ASSIS et al., 2012).

Várias aplicações da nanotecnologia ganharam destaque, incluindo o uso de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), nanoemulsões (Figura 4), nanocápsulas, nanoesferas e o uso de nanocompósitos. Nanopartículas lipídicas sólidas são sistemas de transporte coloidal, foram desenvolvidos para encapsular, proteger e distribuir componentes lipofílicos funcionais, tais como lipídios bioativos e drogas. A fase líquida lipídica e uma solução de surfactante aquoso são homogeneizados em uma temperatura acima da de fusão dos lipídios, para produzir uma fina dispersão de uma emulsão de óleo em água (HELGASON et al., 2009). A partícula é estabilizada por surfactantes, que podem ser compostos de uma única camada, mas normalmente há uma mistura de surfactantes (WEISS et al., 2008). Nanopartículas lipídicas têm uma estrutura semelhante à nanoemulsões, com um tamanho que varia normalmente de 50 a 1000 nm. O núcleo lipídico em nanoemulsões é líquido, mas, em nanopartículas, o núcleo lipídico está no estado sólido (FARHANG, 2007). O uso de lipídios sólidos, em vez de lipídios líquidos, aumenta o controle sobre a cinética de liberação de compostos encapsulados

e melhora a estabilidade de ingredientes lipofílicos sensíveis quimicamente (HELGASON et al., 2009).

As nanopartículas lipídicas são usadas como uma transportadora e os ingredientes ativos são finamente dispersos na matriz lipídica. Os lipídios mais utilizados na obtenção das NLS são triglicerídeos (triestearina), glicídios parciais (monoestearato de gliceril), ácidos graxos (ácido esteárico), esteróis (colesterol) e ceras (cetilpalmitato) (MEHNERT e MÄDER, 2001). Podem ser produzidas por: homogeneização sob alta pressão a quente ou a frio; diluição de microemulsão; preparo de emulsão múltipla; emulsificação/evaporação de solvente, ou difusão de solvente (ASSIS et al., 2012).

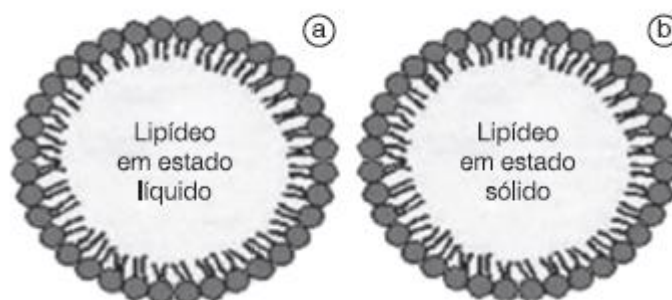


Figura 4. Esquema representativo de nanoemulsão (a) e nanopartícula lipídica sólida (b). Fonte: Mueller et al., 2000.

Nanoemulsões são definidas como sistemas contendo gotículas de óleo, com tamanhos compreendidos entre 10 e 100 nm dispersos em meio aquoso (ASSIS et al., 2012). Alguns estudos relatam variações diferentes para o tamanho das nanoemulsões, como por exemplo, em torno de 20 a 500nm, sendo porém translúcidas quando o tamanho dos glóbulos é inferior a 200nm ou leitosa quando o tamanho está entre 200 e 500nm. Também são referidas na literatura como miniemulsões, emulsões ultrafinas, microemulsões instáveis e submicroemulsões (OLIVEIRA, 2008). Acredita-se que estes sistemas tenham várias vantagens em relação às emulsões convencionais por se tratarem de sistemas de distribuição coloidal devido ao seu menor tamanho de partícula. As nanoemulsões parecem apresentar transparência óptica, funcionalidade aprimorada e estabilidade física, o que as tornaria muito atraentes para a indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia. (ASSIS et al., 2012).

Diferentes das microemulsões que são sistemas termodinamicamente estáveis, as nanoemulsões são sistemas metaestáveis, ou seja, estáveis por um longo período de tempo. A inerente estabilidade das nanoemulsões está diretamente relacionada ao processo de preparo

que confere estabilização estérica, quando se emprega tensoativos não-iônicos e/ou polímeros; e ao diminuto tamanho dos glóbulos, cujo movimento browniano diminui a atuação das forças gravitacionais prevenindo assim fenômenos de instabilidade (OLIVEIRA, 2008).

As nanoemulsões não podem ser formadas espontaneamente, sendo necessária energia, geralmente a partir de dispositivos mecânicos ou a partir do potencial químico dos componentes. Os métodos utilizados para formação de nanoemulsão compreendem a utilização de homogeneizadores de alta pressão e geradores de ultrassom (KENTISH *et al.*, 2008).

Os homogeneizadores de alta pressão são muito utilizados para formar nanoemulsões e geralmente trabalham com pressões entre 50 e 100 MPa. O procedimento do uso de ultrassom para a preparação de nanoemulsões geralmente consiste em primeiramente conduzir o fluido através de um orifício de diâmetro reduzido com pressão moderada e orientado em direção a uma lâmina vibratória, na qual sofre impacto. Quando o sistema atinge uma fase estacionária, entra em cavitação, próximo da extremidade da lâmina, e a vibração desta produz ondas ultrassônicas que são capazes de exercer um efeito cortante, produzindo gotículas de tamanho reduzido (ASSIS *et al.*, 2012). Existem dois mecanismos principais que operam durante o ultrassom emulsificação. Primeiro, um campo acústico produz ondas interfaceadas para quebrar a fase dispersa contida na fase dispersante (ou externa). Em segundo lugar, a formação de cavitação acústica é usada para quebrar microbolhas em gotículas de tamanho nanométrico através de alterações de pressão. O processador ultrassônico aplica excelente força de cisalhamento para a quebra da gotícula, e a taxa de coalescência é determinada pelo uso de mais de um surfactante e a concentração utilizada para cada um deles (CHIEN-WEN *et al.*, 2018).

A emulsificação através de ultrassom também é muito eficiente na redução do tamanho das gotas, mas só é adequada para pequenos lotes. Os estudos realizados por Landfester *et al.* (2004) sobre a preparação de nanoemulsões polimerizáveis mostram que a eficiência do processo de dispersão é fortemente dependente do tempo de ultrassom em diferentes amplitudes; note-se que quanto mais hidrofóbico o monômero, maior o tempo de sonicação necessário (ASSIS *et al.*, 2012).

Para a formulação de uma nanoemulsão é necessário misturar pelo menos três componentes, sendo uma fase oleosa, uma fase aquosa e um estabilizador. A fase oleosa das nanoemulsões óleo-em-água geralmente atua como um portador de compostos ativos

lipofílicos e é a fase dispersa (ou interna) na fase dispersante ou contínua (também chamada de fase externa). Normalmente, os ingredientes ativos lipofílicos são solubilizados na fase oleosa antes da formação da emulsão. A fase oleosa pode ser formulada por diferentes compostos não polares, tais como triglicéridos, óleos minerais ou óleos essenciais. Por outro lado, a fase aquosa das emulsões pode conter uma grande variedade de constituintes solúveis em água, incluindo minerais, ácidos, bases, flavorizantes, conservantes, vitaminas, açúcares, surfactantes, proteínas ou polissacarídeos (ODRIOZOLA-SERRANO *et al.*, 2014).

Além das fases lipídica e aquosa, a formulação de nanoemulsões requer o uso de estabilizadores chamados de emulsificantes ou surfactantes, que previnem a quebra da estrutura da nanoemulsão, após sua formação. Surfactantes são moléculas anfifílicas, ou seja, que possuem uma parte lipofílica que tem afinidade com os meios não-polares e uma parte hidrofílica que tem afinidade com as partes polares da formulação. Eles são capazes de realizar uma “ponte” na interface óleo-água na superfície da gotícula durante a emulsificação, protegendo assim as gotículas contra coalescência ou agregação (ODRIOZOLA-SERRANO *et al.*, 2014).

Ostwald ripening é o principal mecanismo de desestabilização de nanoemulsões uma vez que a cremação é prevenida pelo efeito Browniano que é capaz de superar a força de separação gravitacional e a floculação, pela estabilização estérica proporcionada pelas moléculas do tensoativo. *Ostwald ripening* é o transporte de óleo a partir de pequenos glóbulos para grandes glóbulos através da fase contínua. Ocorre primariamente, via tendência à dissolução molecular do óleo na fase contínua sendo direcionado pela dependência da solubilidade dos glóbulos da emulsão com seu tamanho. Este efeito surge a partir da diferença no potencial químico entre pequenos e grandes glóbulos da emulsão como resultado da diferença da pressão de Laplace. Somente uma pequena diferença no tamanho dos glóbulos é necessária para criar um gradiente de potencial químico suficientemente grande para iniciar *Ostwald ripening*. Portanto, uma inicial diferença no tamanho, torna-se cada vez mais acentuada com o progresso de *Ostwald ripening*. Higuchi, Misra (1962) foram os primeiros a propor que *Ostwald ripening* de emulsões poderia ser retardado pela incorporação de um segundo óleo com uma menor solubilidade na fase contínua. Este conceito está baseado na premissa de que a entropia da mistura fornece um potencial químico oposto ao *Ostwald ripening*. Quando uma mistura de óleos está sob a ação de *Ostwald ripening*, o óleo solúvel tem maior mobilidade entre os glóbulos. Ao longo do tempo, os glóbulos grandes tornam-se

enriquecidos com o óleo solúvel e os glóbulos pequenos tornam-se enriquecidos com o óleo insolúvel. Isto cria um desequilíbrio composicional, que é de entropia maior que um sistema igualmente misturado, e desta forma, *Ostwald ripening* pode ser retardado (WOOSTER; GOLDING; SANGUANSRI, 2008).

A utilização de sistemas de distribuição à base de nanoemulsões, como um método para encapsular ingredientes ativos lipofílicos dispersos em meio aquoso, tem surgido como uma potencial ferramenta para conceber novos produtos cosméticos e alimentares. Um dos principais desafios farmacotécnicos em indústrias de alimentos e cosméticos, quanto a aplicabilidade dos óleos essenciais, deve-se ao controle de parâmetros de solubilidade em meio aquoso, bem como seus aspectos toxicológicos, organolépticos e econômicos quando incorporados em doses elevadas (BURT, 2004). Várias pesquisas recentes relatam a formação de nanoemulsões contendo óleos essenciais como uma estratégia para melhorar sua funcionalidade. Óleos essenciais incorporados em nanoemulsões promovem um aumento da permeabilidade nas membranas microbianas devido ao aumento da área por unidade de peso (ZIANI *et al.*, 2011; DONSI *et al.*, 2011). Isto permitiria reduzir a concentração para obter um efeitos, como ação antimicrobiano, equivalente ou mesmo maior do que em emulsões convencionais (LIANG *et al.*, 2012; SALVIA-TRUJILLO *et al.*, 2014).

As nanoemulsões são usadas em agroquímicos, em fórmulas de entrega de medicamentos e pesticidas, em cosméticos, como transportadores de medicamentos para cuidados pessoais ou produtos para a pele, e em produtos farmacêuticos como matrizes para encapsulamento dos compostos bioativos, que são desejáveis para formulações sem álcool, por exemplo (CHIEN-WEN *et al.*, 2018). As vantagens das nanoemulsões para produtos cosméticos são várias. Devido ao tamanho das partículas, podem cobrir extensa área cutânea sendo indicados como sistemas para liberação de ativos na pele; podem penetrar através da superfície áspera de peles ressecadas (THADROS *et al.*, 2004); seu diâmetro muito pequeno das partículas permite a deposição uniforme nos substratos. A molhabilidade, espalhabilidade e penetração podem ser aumentadas como resultado da baixa tensão superficial do sistema e da baixa tensão interfacial das gotículas O/A. Os aspectos físicos (transparência e fluidez) e ausência de espessantes podem garantir excelente aspecto estético e sensorial na pele. Ao contrário de microemulsões, exigem quantidades não excessivas de tensoativos, na faixa de 5 a 10%. Podem ser substitutas de lipossomas e vesículas que são menos estáveis, permitindo em

alguns casos a formação de fases cristalinas lamelares ao redor das gotículas da nanoemulsão (THADROS *et al.*,2004).

As melhores micelas dentro de uma nanoemulsão são preparadas baseando-se em um ótimo equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) e na concentração ideal de surfactante (IZQUIERDO *et al.*,2005). O valor apropriado de EHL dos surfactantes é importante para a formação da emulsão. As nanoemulsões são geralmente formuladas com o objetivo de aumentar a estabilidade de uma formulação, e isso ocorre pelo uso de um ou mais surfactantes, devido à ampla distribuição do comprimento de cada cadeia. Os surfactantes do tipo Span e Brij são comumente usados como surfactantes em emulsão em uma ampla variedade de produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos. Surfactantes do tipo Brij possuem uma região hidrofílica ramificada com três cadeias de polioxietileno substituído por um anel de sorbitano, e surfactantes tipo Span tem um grupo de cabeça grande que pode potencialmente se ligar na interface óleo / água e formam uma região hidrofóbica. Sistemas de distribuição baseados em nanoemulsão com constituintes incorporados aumentando significativamente a atividade antimicrobiana em comparação com sistemas não encapsulados. Os sistemas podem aumentar a concentração do composto bioativo em áreas onde os micro-organismos estão preferencialmente localizados (CHIEN-WEN *et al.*,2018).

Nanocápsulas são compostas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo no qual se encontra o composto ativo dissolvido ou adsorvido a parede polimérica. Envolve a incorporação, absorção ou dispersão de combinações de bioativos sólidos, líquidos ou gasosos dentro ou em vesículas pequenas, com diâmetro na escala nanométrica. As combinações de bioativos incorporados podem ser protegidas contra degradação e melhorar a estabilidade e a solubilidade (por exemplo, solubilização de componentes hidrofílicos em matrizes hidrofóbicas e vice-versa). A retenção desses núcleos é regida por sua funcionalidade química, solubilidade, polaridade e volatilidade (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). O material de parede consiste na barreira externa e geralmente é feito de compostos que formam uma rede com a estrutura. Esses compostos são normalmente polímeros (amidos, gomas, gelatinas).

O principal objetivo da encapsulação é proteger uma substância sensível na cápsula ou na parede, isolando fisicamente o ingrediente do meio ambiente. Atualmente, os interesses essenciais são atribuídos ao encapsulamento de *flavors*, lipídeos e carotenoides, entre outros ingredientes; ressalta-se que, em função de um único agente encapsulante não possuir todas as

propriedades do material de parede ideal, pesquisas recentes têm focado em misturas de carboidratos, gomas e proteínas (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

Os lipídios estão entre os compostos com interesse de encapsulação. Matsuno e Adachi (1993) enumeraram cinco vantagens do uso de lipídio como material de encapsulamento: retardar a auto-oxidação; melhorar a estabilidade; controlar a liberação de sabor de substâncias lipossolúveis; mascarar o gosto amargo de substâncias lipossolúveis, e proteger as substâncias dissolvidas contra a hidrólise enzimática. Lipídios, especialmente aqueles que contêm alto teor de ácidos graxos insaturados, têm sido encapsulados visando diminuir a susceptibilidade à oxidação (FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2008).

As nanocápsulas são constituídas por uma parede polimérica disposta ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica, como foi dito anteriormente. Por outro lado, as chamadas nanoesferas, não apresentam óleo em sua composição, portanto não apresenta um núcleo diferenciado. Elas são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido, conforme mostra a figura 5 (MICHELS, 2016).

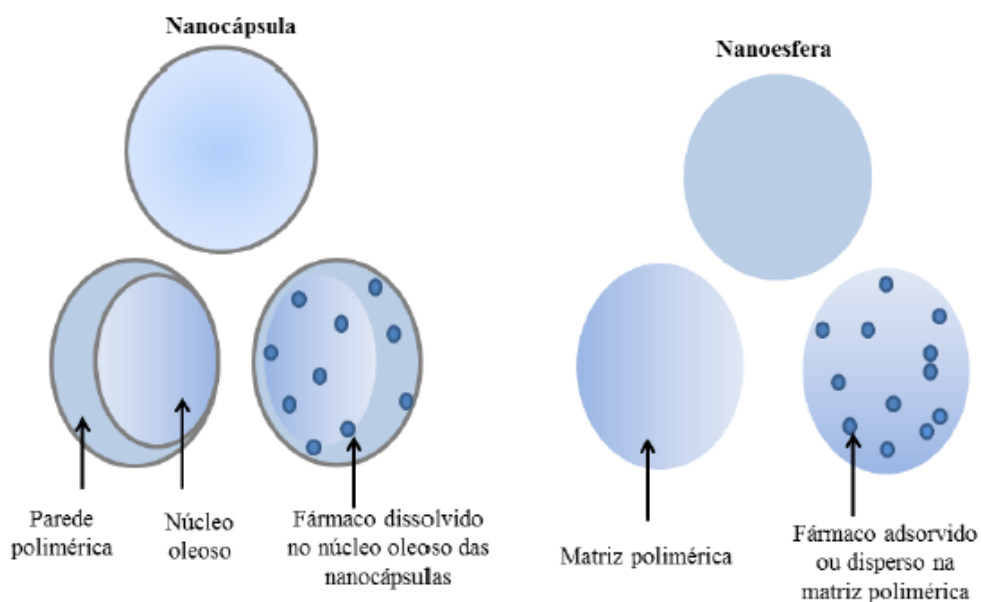


Figura 5. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas. Fonte: Michels, 2016.

Os sistemas nanoestruturados têm a capacidade de melhorar características importantes dos fármacos tais como a biodisponibilidade e a solubilidade. Além disso, oferecem uma abundância de possíveis soluções para problemas de liberação e ainda para superar obstáculos importantes, como barreiras intestinais e à barreira sangue-cérebro. Além

disso, esses sistemas apresentam a capacidade de modificar propriedades físico-químicas de compostos, protegendo-os de processos de degradação ou de interações indesejadas, diminuindo assim reações adversas quanto se trata de um fármaco, por exemplo (MICHELS,2016).

2.6.1 Nanopartículas de Prata (AgNP)

Partículas inorgânicas nanométricas, de natureza simples ou complexa, exibem propriedades físicas e químicas únicas e representam um material cada vez mais importante para o desenvolvimento de novos nanodispositivos que podem ser usados em numerosos produtos para aplicações nas áreas física, biológica, biomédica e farmacêutica (SONDI e SALOPEK-SONDI, 2004). Vários tipos de metais como magnésio, ferro, ouro, cobre, zinco, prata e alginato podem ser utilizados na síntese de nanopartículas (RAJESHKUMAR e BHARATH, 2017). Apenas no século 21 a ciência moderna começou a explorar a nanociência (PRASAD e ELUMALAI, 2011).

As nanopartículas de metais têm uma grande área superficial e alta fração de átomos em sua superfície, garantindo suas características físico-químicas únicas, como atividade catalítica, as propriedades ópticas, eletrônicas, antibacterianas e magnéticas (PRASAD e ELUMALAI, 2011).

A síntese de nanopartículas nobres pode ocorrer via síntese química, física ou biológica. Geralmente nanopartículas de metal são sintetizadas e estabilizadas pelo uso de métodos químicos como a redução química, técnicas eletroquímicas, via micro-ondas e atualmente via síntese verde. O uso de plantas na síntese de nanopartículas é bastante recente e lidera verdadeiramente a química verde fornecendo avanços sobre métodos químicos e físicos, pois é mais rentável e *eco-friendly*, é facilmente utilizado para sínteses em larga escala e neste método não há necessidade de usar alta pressão, energia, temperatura e produtos químicos tóxicos. Bactérias e fungos podem ser usados também para a síntese biológica de nanopartículas, mas o uso de extratos de folhas é mais vantajoso, pois reduz custos e não exige de nenhuma preparação especial de cultura e técnicas de isolamento (PRASAD e ELUMALAI, 2011).

Quase 5000 anos atrás, romanos, gregos, egípcios e indianos usavam prata de várias formas para preservar produtos alimentícios. Na antiguidade, utensílios de prata para comer e beber e usados para preservar itens comestíveis e bebidas eram usados, talvez devido à

consciência de possível ação antimicrobiana. Atualmente, as AgNPs receberam grande atenção dos cientistas devido a sua notável defesa contra vários micro-organismos patogênicos (RAJESHKUMAR e BHARATH, 2017).

AgNPs e compostos baseados em prata são extremamente citotóxicos para vários micro-organismos, exibindo efeitos biocidas robustos em várias espécies de bactérias, incluindo *Escherichia coli*, *Staphylococcus* e *Streptococcus mutans*. Assim, as AgNPs têm sido amplamente utilizadas contra doenças bacterianas, incorporadas em materiais odontológicos, tratamento de queimaduras graves na pele e purificação de água, entre outras (RAJESHKUMAR e BHARATH, 2017). Klabunde e colaboradores demonstraram que nanopartículas de óxido de metal são altamente reativas e exibem ação biocida excelente contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (KLABUNDE et al., 2002). Há diversas propostas na literatura para a ação bactericida de íons e nanopartículas de prata sendo a mais citada a reação destas estruturas com proteínas dos micro-organismos devido a forte interação da prata com os grupos sulfidrilas (SH) das proteínas levando a inativação das mesmas (ZHENG E HUANG, 2004). As AgNPs são usadas em vários campos, incluindo o médico, alimentício, de saúde, de consumo e industrial devido às suas propriedades físicas e químicas únicas. Estas incluem propriedades óticas, biológicas, elétricas, térmicas e alta condutividade elétrica. Devido às suas propriedades peculiares, elas têm sido usadas para diversas aplicações, inclusive como agentes antibacterianos, em produtos industriais, domésticos e relacionados à saúde, em produtos de consumo, revestimentos de dispositivos médicos, sensores ópticos e cosméticos, na indústria farmacêutica, na indústria alimentícia, em diagnósticos, ortopedia, administração de drogas como agentes anticancerígenos, e finalmente por aumentarem a capacidade de eliminar tumor dos fármacos contra o câncer. Recentemente, tem sido usadas em muitos tecidos, tecidos, curativos e dispositivos biomédicos (ZHANG et al., 2016). As nanopartículas de prata podem ser associadas a outras substâncias como antimicrobianos como gentamicina e amoxicilina (RAI et al., 2009). Esta associação direciona estes fármacos para alvos específicos, além de potencializar o seu efeito e diminuir a resistência a antimicrobianos (GIMENEZ et al., 2005).

Avanços recentes em nanociência e nanotecnologia mudaram radicalmente a forma de diagnósticos, tratamentos e prevenção de várias doenças em todos os aspectos da vida humana. As AgNPs são um dos nanomateriais mais vitais e fascinantes entre as várias nanopartículas metálicas que estão relacionadas com aplicações biomédicas pois

desempenham um papel importante na nanociência e na nanotecnologia, particularmente na nanomedicina (ZHANG et al.,2016)

2.7 Nanotecnologia e Cosméticos:

Muitos ativos naturais pesquisados ultimamente são compostos instáveis, podendo sofrer reações que levam à diminuição ou perda de eficácia e até mesmo a degradação do produto. Por isso, novas tecnologias vêm sendo propostas para melhorar o desempenho dos produtos cosméticos e sua aceitação pelo consumidor. Uma alternativa para aumentar a estabilidade e, ainda, permitir a liberação controlada é o encapsulamento das substâncias ativas através de técnicas que envolvem a nanotecnologia (DAUDT et al.,2013).

Na escala nanométrica, as propriedades dos materiais podem mudar de forma drástica, denominando-se “efeitos quânticos” a essas mudanças. Os átomos passam a revelar características peculiares, podendo apresentar condutividade elétrica, elasticidade, maior reatividade química, maior resistência, cores diferentes, entre outras características, apenas reduzindo o tamanho, sem mudar a substância (BARIL et al.,2010).

Uma classe de ativos que podem ser encapsulados são os compostos extraídos de vegetais. Os extratos vegetais são fontes promissoras de substâncias bioativas, porém em seu estado bruto podem ter as atividades comprometidas em razão de sua instabilidade físico-química (DAUDT et al.,2013).

As nanopartículas, em geral, são caracterizadas por possuírem uma alta superfície de contato e um grande número de partículas por unidade de peso. Para a formação de nanopartículas, a área de superfície por unidade de peso da partícula aumenta 10^2 vezes quando a partícula é reduzida de 1 μm para 10 nm e o número de partículas por peso aumenta 10^6 vezes. Com isso, as propriedades originais do material bruto, como, por exemplo, a temperatura de fusão e a solubilidade, também se modificam. Com base nas características decorrentes do tamanho diminuto, as nanopartículas contendo substâncias ativas são utilizadas com a intenção de melhorar sua funcionalidade, como, por exemplo, melhorar a disponibilidade ou estabilidade quando comparada com o mesmo material na forma molecular (MIHRANYAN et al.,2012).

A produção de nanocosméticos, especificamente falando, está mundialmente inserida na indústria de cosméticos convencionais, constituindo-se em uma linha de produtos

diferenciados de base nanotecnológica e sendo geralmente classificado como um setor específico da indústria química juntamente com os produtos de higiene pessoal e perfumaria. Os produtos cosméticos formulados utilizando a nanotecnologia são utilizados, por exemplo, para conferir uma melhor proteção aos raios UV, uma penetração mais profunda na pele potencializando os efeitos prometidos. A diminuição do tamanho de sua estrutura permite um aumento na estabilidade e prazo de validade do produto (GONÇALVES e MEJIA, 2014).

Os sistemas nanoestruturados mais utilizados em cosméticos podem ser classificados em nanocápsulas, nanoesferas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões, microemulsões e lipossomas. As nanoemulsões apresentam elevada estabilidade cinética, em decorrência do seu reduzido tamanho de gota. Uma das vantagens apresentadas ao se utilizar nanoemulsões é o aumento da hidratação da pele e de sua elasticidade, uma vez que o ativo tem maior possibilidade de atingir o extrato córneo (DAUDT et al., 2013). Devido ao seu pequeno e uniforme tamanho de gota, as nanoemulsões são transparentes, fluidas e agradáveis ao toque (SARKER, 2005; GUGLIELMINI, 2008).

A nanotecnologia tem sido utilizada no desenvolvimento de formulações cosméticas mais estáveis, mais eficazes e com sensorial cosmético diferenciado (DAUDT et al., 2013). Ela oferece uma perspectiva de grandes avanços que permitem melhorar a qualidade de vida nas diferentes áreas de saúde e ajudar a preservar o meio ambiente. Assim, este tipo de tecnologia permite investigar novas oportunidades que podem ser aplicadas positivamente em diferentes campos da ciência (GONÇALVES e MEJIA, 2014).

3 OBJETIVOS:

3.3 Objetivos Gerais:

Desenvolver uma nanoemulsão utilizando o óleo essencial do *Cymbopogon martinii* (palmarosa) e seu composto majoritário com estabilidade em suas propriedades físico-químicas e com potencial antimicrobiano sobre o agente infeccioso responsável por causar a acne vulgar chamado de *Cutibacterium acnes*.

3.4 Objetivos Específicos:

- Desenvolver nanoemulsão para o óleo essencial de palmarosa e para geraniol;
- Testar a estabilidade das nanoemulsões desenvolvidas;
- Verificar a atividade antimicrobiana do geraniol, do óleo essencial, e das respectivas nanoemulsões sobre linhagens ATCC da bactéria *Cutibacterium acnes* e em alguns casos para *Staphylococcus epidermidis*;
- Adicionar as nanopartículas de prata (AgNP) as nanoemulsões e testar seu potencial antimicrobiano;

4 MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 Obtenção dos compostos testados (Óleo Essencial de *Cymbopogon martinii* e Geraniol)

O óleo essencial da palmarosa (Lote: 1216043BS; validade: dezembro de 2019) foi obtido da empresa BySamia *Ltda*. O composto majoritário desse óleo, o geraniol, foi comprado da empresa Sigma Aldrich (Lote: 1002492615; validade: fevereiro de 2022).

4.2 Caracterização do óleo essencial de palmarosa

Apesar de ser um produto comercialmente obtido, ainda assim foi realizada a caracterização química do lote. Essa análise foi realizada no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), localizado em Campinas, São Paulo.

Os constituintes do óleo essencial foram identificados comparando os tempos de retenção dos picos do cromatograma com os dos compostos de referência executados sob condições idênticas, por comparação dos índices de retenção com os dados da literatura. Os picos dos espectros de massa foram comparados com os dos compostos padrões reportados na literatura. As quantidades relativas de constituintes individuais foram calculadas a partir de áreas de pico sem correção do fator de resposta do DIC. (RAO et al.,2004). A medida é baseada em íons gerados durante a queima dos eluatos em uma chama de H₂ e ar. Áreas de pico e tempos de retenção foram medidos pelo integrador eletrônico (GRANDE, 2018).

A separação e quantificação (método de normalização de área) das substâncias foram realizadas em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, GC-2010) utilizando coluna capilar de sílica fundida: DB-5(J&W Scientific; 30,0 m x 0,25 mm x 0,25µm; gás de arraste hélio (1 mL/min) e split 1/20. Foi injetado 1µL de solução (1 µL do óleo essencial em 1mL de acetato de etila - grau Cromatográfico) no seguinte programa de temperatura: 60 °C-240 °C, 3 °C/min.

A identificação das substâncias foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), operando por impacto de elétrons (70 eV). Coluna capilar de sílica fundida: OV-5 (Ohio Valley Specialty Chemical, Inc. 30,0 m x 0,25mm x 0,25µm); gás de arraste hélio (1 mL/min) e split 1/20. Foi injetado 1 µL da solução (1 µL do óleo essencial em 1mL de acetato de etila - grau Cromatográfico) operando nas mesmas condições que o CG-DIC.

As substâncias foram identificadas pela comparação de seus espectros de massas com o banco de dados do sistema (CG-EM) e índices de retenção (IR) com dados de literatura (Adams, 2017). Para a obtenção dos IR das substâncias foi empregada uma mistura de hidrocarbonetos (C₉-C₂₄ - Sigma Aldrich 99%), analisada nas mesmas condições operacionais das amostras e aplicando-se a equação de Van den Dool & Kratz, 1963 (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963).

4.3 Preparo das nanoemulsões

4.3.1 Tensoativos utilizados

O preparo das formulações de nanoemulsões foi realizado pelo método de emulsão por fase direta, ou seja, fase oleosa foi adicionada a fase aquosa que estava sob agitação em homogeneizador de alta energia (sonicador ultrassônico/ disruptor de célula ultrassônico- Modelo DES500, Marca Unique) a temperatura ambiente (25° C). A fase oleosa é constituída pelo óleo essencial ou geraniol e tensoativo Span 80. A fase aquosa é constituída do surfactante Tween 20 e água destilada. As formulações foram preparadas sob efeito de sonicador ultrassônico. A fase aquosa permanecia cerca de 5 minutos no equipamento e depois a fase oleosa era gotejada vagarosamente (10 a 20 gotas por minuto). A mistura coloidal permanecia mais 10 minutos no homogeneizador ultrassônico.

Abaixo estão os dados dos surfactantes utilizados e uma representação estrutural de suas moléculas (figura 6). Ambos são surfactantes neutros, ou seja, sem cargas elétricas positivas (surfactantes catiônicos) ou negativas (surfactante aniônico). Span 80 é um surfactante com características lipofílicas e Tween 20 com características hidrofílicas.

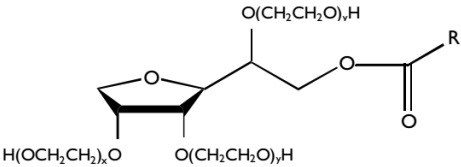
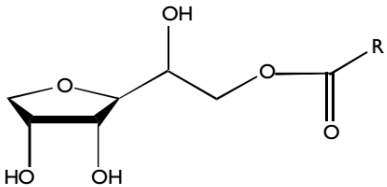
	
Monolaurato de sorbitano etoxilado 20 OE INCI: <i>polysorbate 20</i> Nome comercial: Tween[®] 20 Valor de EHL =16,7 Fornecedor: Inlab Confiança	Monooleato de sorbitano INCI: <i>sorbitan monooleate</i> Nome comercial: Span[®] 80 Valor de EHL: 4,3 Fornecedor: Inlab Confiança

Figura 6. Estrutura química e caracterização dos tensoativos utilizados no preparo da nanoemulsão.

As nanoemulsões foram obtidas com uma concentração de óleo fixa em 1,5% m/m. A quantidade de tensoativos foi mantida constante sempre a 5,0 %. A avaliação da estabilidade física e propriedades físico-química estavam relacionadas à variação da composição das nanoemulsões em termos dos valores de EHL (entre 6,78 e 11,74) conforme mostra a tabela 1. Para o cálculo das quantidades do tensoativo hidrofílico (Tween 20) e do tensoativo lipofílico (Span 80) em função dos valores de EHL, foi utilizada a seguinte equação:

$$A + B = 100 \quad (1)$$

$$EHL_{\text{Resultante}} = EHLA \times 0,01A + EHLB \times 0,01B \quad (2)$$

Onde:

A= porcentagem do tensoativo hidrofílico;

B=porcentagem do tensoativo lipofílico

EHLA=Equilíbrio Lipofílico de A;

EHLB= Equilíbrio Hidrofílico de B;

EHLresultante = Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico Resultante.

A partir desta equação foi possível determinar os valores de EHL encontrados na tabela 1.

Tabela 1. Formulações para nanoemulsões com seus respectivos valores de EHL.

Amostras	óleo % m/m	Tween 20 % m/m	Span80 % m/m	EHL	água % m/m
OE1 e G1	1,5	1,0	4,0	6,78	93,5
OE2 e G2	1,5	1,5	3,5	8,02	93,5
OE3 e G3	1,5	2,0	3,0	9,26	93,5
OE4 e G4	1,5	2,5	2,5	10,5	93,5
OE5 e G5	1,5	3,0	2,0	11,74	93,5

A formulação da Tabela 1 que apresentou melhor resultado em termos de estabilidade foi também avaliada quanto ao efeito sinérgico de ação antimicrobiana do óleo essencial e do geraniol com a nanopartículas de prata (massa a ser adicionada: 0,5 mg).

4.4 Caracterizações das nanoemulsões

A caracterização das nanoemulsões foi realizada seguindo os seguintes parâmetros: potencial zeta/sizer, valor do pH, viscosidade, condutividade, densidade, cor, centrifugação, estresse térmico, microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG).

4.4.1 Avaliação Macroscópica

Esta avaliação tem como objetivo buscar sinais de instabilidade após vinte e quatro horas de realização do preparo das formulações. Foram analisados sinais de cremeação ou de separação de fases, além de aspectos físicos como translucência e fluidez.

4.4.2 Testes de Estabilidade

4.4.2.1 Cor

Observação visual da variação de cores entre as formulações quanto a serem opacas ou translúcidas ao longo de todo tempo do experimento.

4.4.2.2 Teste de Centrifugação

O teste de centrifugação foi realizado em duplicata, utilizando a centrífuga Eppendorf, modelo 5810R, com controle de temperatura. As amostras foram colocadas em tubos de plástico graduados (5 g) e então submetidas à centrifugação. As determinações foram realizadas a 800, 1800 e 3000 G permanecendo 30 minutos em cada uma das velocidades, sob a condição de temperatura de 25°C

4.4.2.3 Estresse térmico

Cada formulação de nanoemulsão (cerca de 4mL) foi colocada em três tubos plásticos graduados. Os frascos foram então submetidos a aquecimento na faixa de 25 °C a 80 °C, aumentando a temperatura de 5 em 5 °C até atingir a temperatura final de 80 °C. Os tubos permaneciam 30 minutos em cada temperatura. As amostras foram analisadas quanto à ocorrência ou não de separação de fases ou modificações. Para aquecimento foi utilizado aparelho de banho-maria termostático da QUIMIS, modelo Q215m2. O teste do estresse térmico foi realizado em triplicata.

Para a avaliação das modificações utilizou-se as seguintes siglas:

- NR: sem alterações e homogêneo;
- LM: levemente modificado, porém sem separação de fases;

- SF: não homogêneo, com separação de fases.

4.4.2.4 Tamanho médio das partículas/Potencial Zeta

Foram empregados testes para identificar o diâmetro das partículas (técnica de Espalhamento Dinâmico da Luz - DLS, *Dynamic Light Scattering*), índice de polidispersividade (IPD) e potencial zeta. Os experimentos foram realizados usando o equipamento Zetasizer/Nanoseries modelo Nano ZS, marca Malvern, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, campus de Araraquara.

As amostras foram previamente diluídas em solução de 1mM de NaCl antes de serem aplicadas no aparelho. A diluição dos compostos em NaCl 1 mM foi de 1:100.

4.4.2.5 Determinação do valor do pH

Os valores de pH foram aferidos em triplicata, após diluição das amostras na proporção de 1:10, utilizando um medidor de pH de bancada GEHAKA, modelo PG 2000. O equipamento realiza compensação automática de temperatura (ATC) na faixa de -20 a 120 °C.

A avaliação foi feita antes e depois das formulações serem submetidas ao estresse térmico, e após determinados períodos do preparo das amostras (dias 0, 40, 120 e 270).

4.4.2.6 Condutividade

Os testes foram realizados em triplicata. O equipamento utilizado foi o condutivímetro portátil modelo CON-500, da marca Ion. Os valores de condutividade elétrica das nanoemulsões foram avaliados nas amostras recém-preparadas e após armazenamento a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ após 40, 120 e 270 dias.

Para a avaliação da condutividade, as nanoemulsões foram separadas em diferentes frascos e o eletrodo foi adicionado diretamente nas amostras. O condutivímetro portátil foi calibrado com solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

4.4.2.7 Viscosidade

As análises da viscosidade foram realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, campus de Araraquara. O equipamento utilizado foi um reômetro da marca TA, modelo Discovery HR-1.

Para analisar a viscosidade através do comportamento reológico das amostras empregou-se reômetro de gradiente e tensão de cisalhamento controlados Instruments

Rheometers AR 2000 TA, modelo AR 2000, no modo de fluxo, na temperatura de 32°C com geometria cone-placa paralelas de 40 mm de diâmetro, separadas por uma distância fixa de 0,052 mm. Cuidadosamente, as amostras foram aplicadas à placa inferior, assegurando-se o mínimo cisalhamento da formulação e o tempo de repouso necessário (relaxamento da tensão introduzida prévia a análise) de 5 minutos anteriores a cada determinação. As curvas ascendente e descendente de fluxo foram geradas a partir de um gradiente de cisalhamento que tinha como intervalo de 0 s⁻¹ a 100 s⁻¹. O gradiente de cisalhamento foi aumentado durante um período de 120s, mantido no limite superior por 10s e, então, diminuído durante um período de 120s. A seleção de faixa de cisalhamento foi determinada de acordo com a consistência de cada formulação (BRUSCHI, 2007; JONES et al., 2009). O ensaio foi realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, campus de Araraquara.

A viscosidade foi medida em dois tempos, ou seja, imediatamente após a preparação das nanoemulsões e depois de 6 meses de seu preparo.

4.4.2.8Densidade

Esta análise foi realizada utilizando-se balança analítica Bel Engineering, classe I, modelo M214Ai proveta e béquer em temperatura controlada de 25°C.

Para obtenção dos valores de densidade, foi medida a massa de cada formulação, em relação ao volume total da solução obtida de 50 mL e aplicado na fórmula: $D=m/V$.

4.4.3 Análises Microscópicas:

4.4.3.1Caracterização morfológica pela técnica de microscopia Óptica

Para a análise microscópica, foi utilizado um microscópio óptico da marca Nikon, modelo Eclipse E200, para a observação da homogeneidade e morfologia da dispersão. Uma gota de cada formulação foi colocada sobre uma lâmina de vidro para microscopia e recoberta com uma lamínula. Todas as lâminas foram analisadas na objetiva de 40x.

4.4.3.2 Caracterização morfológica pela técnica de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

A análise morfológica e estrutural das nanoemulsões foi realizada no microscópio eletrônico de varredura da Unesp, campus de Bauru, da marca Zeiss, modelo EVO LS15,acomplado ao software SmartSEM™ . As amostras foram diluídas 1:100 em água

destilada, levadas até o laboratório de microscopia uma semana antes da análise, colocadas sobre suportes metálico de amostras (*stub*) que possuíam uma fita dupla-face de carbono para fixar o material e cola condutora de silício para fixar o material e melhorar sua condutividade. Elas então ficaram dentro de placas de vidro tampadas para secagem em temperatura ambiente por 12 horas. No dia da análise a amostra foi metalizada com ouro no equipamento da marca Quorum Technologies, modelo Q150R-ES e depois visualizada no MEV.

Com objetivo de uma melhor resolução de imagens, a amostra número 1 da nanoemulsão de óleo essencial de *Cymbopogon martinii* foi analisada no Instituto de Química, na Unesp, campus de Araraquara. O equipamento utilizado foi o microscópio eletrônico de alta resolução de emissão por campo (MEV-FEG) marca JEOL, modelo JSM-7500F, com software de operação PC-SEM v 2,1,0,3, equipado com detectores de elétrons secundário, retroespalhados e análise química (energy dispersive spectroscopy - EDS) da marca Thermo Scientific, modelo Ultra Dry, com software de operação NSS 2.3.

4.4.3.3 Caracterização química e estrutural por espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier

As análises da espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier acoplado a acessório de reflectância total atenuada (ATR-FTIR) foram realizadas no Instituto de Química da Unesp, campus de Araraquara. O equipamento utilizado foi o Bruker-RAM III, Platinum ATR, modelo Vertex 70. Os espectros na região do infravermelho médio (FT-IR) foram adquiridos em condições experimentais de resolução igual a 4 cm^{-1} e 32 varreduras e um intervalo de varredura de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ em temperatura ambiente.

Antes de serem aplicadas ao equipamento, uma gota de cada uma das nanoemulsões foi colocada sobre lâminas de vidro que permaneceram em repouso por uma semana antes da leitura.

4.5 Preparação das nanopartículas de prata (AgNP)

A preparação das nanopartículas de prata seguiu a metodologia chamada síntese verde. A síntese verde, diferente de métodos físicos ou químicos, envolve o uso de extratos de plantas, bactérias ou fungos com forte potencial para reduzir íons de prata de forma rápida, ou seja, transformar Ag^+ em Ag^0 e assim formar nanopartículas de prata. Métodos biológicos são melhores em relação a procedimentos químicos, pois são *eco-friendly* e convenientes

(PRASAD e ELUMALAI, 2011). Eles têm mostrado alto rendimento, solubilidade e alta estabilidade (ZHANG et al.,2016). Neste estudo foi utilizado o extrato vegetal do chá verde para a síntese verde.

Inicialmente foi preparada uma solução estoque de AgNO_3 30 mM. Para isso foi dissolvido 4,10 mg de AgNO_3 (MM 169,87 g/mol) em 800 μL de água ultrapura, em um microtubo de polipropileno, de 1,5 mL, com o auxílio de um agitador de tubos, que depois foi mantido protegido da luz.

Em seguida, preparou-se o extrato aquoso da *Camellia sinensis* (chá-verde), da marca Yamamotoyama (lote 326, validade: 20/08/2019) comprado comercialmente em uma loja de produtos naturais. Cerca de 10 g do material vegetal foi triturado e fervido por 2 minutos em 50 mL água ultrapura utilizando um agitador magnético capaz de manter o aquecimento. Após repouso de 1 minuto, houve uma filtração em papel Whatman (número 1). Foi obtido assim um extrato de cor verde claro opaco. Algumas medidas de absorbância na faixa de 200 a 800 nm foram realizadas após as diluições 1:25, 1:50 e 1:100 no equipamento UV-M51 da BEL Engineering, utilizando o software UV-PROFESSIONAL para gerar gráficos.

A etapa da preparação do extrato vegetal aquoso deve ocorrer sempre imediatamente anterior ao uso.

4.5.1 Síntese verde de AgNP

O volume total a ser preparado era de 25 mL, utilizando um balão volumétrico. Para isso adicionou-se 2,5 mL do extrato vegetal, 832,5 μL de solução estoque de AgNO_3 e completou-se o volume com 25 mL de água ultrapura. Foi realizado um ajuste de pH para que o mesmo permanecesse em 8,0, e para isso foi adicionada uma gota de NaOH 0,1 M, o que levou a mudança imediata da cor da solução de verde para cor castanha-avermelhada (cor de tijolo), que é a cor esperada e que indica a formação da nanopartículas de prata (AgNP). A mistura ficou em agitação por 24 horas a temperatura ambiente. Medidas de absorbância foram realizadas de 15 em 15 minutos na primeira hora de agitação, após 1 hora e depois de 24 horas de agitação no equipamento UV-M51 da BEL Engineering. Após esse período, a solução foi centrifugada a 3600RPM por cerca de 1 hora e então ocorreu a formação de um pellet no fundo dos tubos de ensaio. Essa é uma etapa crítica, no qual o sobrenadante tem que ser descartado cuidadosamente, o pellet deve ser lavado 2 vezes com água ultrapura, e então transferido delicadamente para um eppendorf de fundo cônico de 1,5 mL e pesado. O final do

processo inclui a adição de 1,0 mL de citrato de sódio para evitar oxido-redução do material. A solução deve ser sempre protegida da luz e armazenada a 4 °C.

O total de AgNP junto de citrato de sódio preparado foi de 1,0mL, que foi então dividido (500 µL) em duas formulações de nanoemulsões, uma contendo o OE de palmarosa e a outra com geraniol garantindo formulações com 1% de AgNP. As nanopartículas de prata foram adicionadas junto a parte aquosa (água e surfactante hidrofílico) durante a preparação das nanoemulsões de OE e G.

4.6 Atividade antimicrobiana

Foram realizados ensaios microbiológicos para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), da concentração bactericida mínima (CBM), análises por disco difusão e curva de sobrevivência (*Time Kill Curve*) para verificar as ações tanto dos compostos isoladamente, bem como para as nanoemulsões preparadas com esses compostos (total de 10 nanoemulsões) e com a inclusão da prata (AgNP) frente às cepas padrões *American Type Culture Collection* (ATCC) da bactéria *Cutibacterium acnes* (ATCC11827, 11828 e 6919) e do *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228 e 35984). Os testes foram realizados em duplicata e a clindamicina foi utilizada como fármaco padrão, pois é considerada, dentre outros, um dos antimicrobianos de uso no tratamento da acne

No quadro 1, encontram-se as informações sobre os testes microbiológicos e os antimicrobianos testados além das bactérias ATCC utilizadas nos ensaios. Destaca-se o fato que nem todas as bactérias foram utilizadas em todos os ensaios.

Quadro 1. Compostos utilizados nos testes microbiológicos e cepas ATCC usadas em cada teste.

Teste	Composto Utilizado	<i>C. acnes</i>	<i>S. epidermidis</i>
CIM	OE palmarosa	6919,11828 e 11827	12228 e 35984
	Geraniol		
	Nanoemulsão de OE (formulação 3)		
	Nanoemulsão de G (formulação 3)		
	Nanoemulsão de OE (formulação 3) + AgNP		
	Nanoemulsão de G (formulação 3) + AgNP		
	Nanoemulsão de OE (formulação 1,2,3,4,5)	11828	---
	Nanoemulsão de G (formulação 1,2,3,4,5)		
CBM	OE palmarosa	6919,11828 e 11827	12228 e 35984
	Geraniol		
	Nanoemulsão de OE (formulação 3)		
	Nanoemulsão de G (formulação 3)		
	Nanoemulsão de OE (formulação 3) + AgNP		
	Nanoemulsão de G (formulação 3) + AgNP		

	Composto	<i>C. acnes</i>	<i>S. epidermidis</i>
CBM	Nanoemulsão de OE (formulação 1,2,3,4,5)	11828	---
	Nanoemulsão de G (formulação 1,2,3,4,5)		
Disco Difusão	OE palmarosa	6919,11828 e 11827	---
	Geraniol		
	Nanoemulsão de OE (formulação 3)		
	Nanoemulsão de G (formulação 3)		
	Nanoemulsão de OE (formulação 3) + AgNP		
	Nanoemulsão de G (formulação 3) + AgNP		
<i>Time Kill Curve</i>	OE palmarosa	6919	---
	Geraniol		
	Nanoemulsão de OE (formulação 3)		
	Nanoemulsão de G (formulação 3)		

4.6.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Todos os ensaios e/ou cultivos das cepas de *Cutibacterium acnes* foram realizados em jarras de anaerobiose do tipo GasPak™ com geradores de anaerobiose da marca BD BBL a 37° C/48 horas enquanto os ensaios com *S. epidermidis* foram realizados em condições normais de cultivo, ou seja, 37° C/24 horas.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos compostos foram obtidas utilizando a metodologia da microdiluição REMA (Resazurin Microtiter Assay Plate) em meio de Mueller Hinton Caldo sendo que estes ensaios também serviram para obtenção das respectivas concentrações bactericidas mínimas (CBM) realizando subculturas em placas de RCA

(*Reinforced Clostridium Agar*), que é o meio de cultura específico para bactérias como a *C. acnes*.

Antes do início desses testes, as cepas padrões de *C. acnes* foram retiradas do freezer (-80° C) e com o auxílio de alças descartáveis estéreis, as cepas foram inoculadas em placas de meio RCA à 37° C/ 48 horas em condições de anaerobiose.

Antes de adicionar a bactéria, foram preparadas concentrações decrescentes de 5.000 a 39,06 µg/mL com os seguintes compostos: óleo essencial, geraniol, nanoemulsão ou nanoemulsão com partícula de prata e concentrações que variaram 312,5 até 0,61 µg/mL para o fármaco padrão clindamicina. O preparo das concentrações nas microplacas estéreis com 96 poços iniciou-se com um volume de 100 µL de meio de cultura Muller Hinton Caldo (MHC) em todos os poços, com exceção dos primeiros de cada fileira. Nestes, 200 µL dos compostos a serem testados foram colocados e então se realizou uma microdiluição seriada manualmente, que consiste em pipetar 100 µL do poço de número 1, adicionar ao poço de número dois, homogeneizar, retirar 100 µL, passar para o poço 3, homogeneizar e assim sucessivamente.

Uma vez que as placas e respectivas concentrações já preparadas, a jarra de anaerobiose foi aberta e o inóculo foi preparado. As cepas foram adicionadas a solução salina 0,85% até obterem um índice de turbidez de 0,5 no padrão de McFarland, o que equivale a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. O inóculo inicial para cada poço da microplaca foi calculado e preparado na concentração equivalente a 10^5 - 10^6 UFC/mL, tendo utilizado também um volume de 100 µL da bactéria diluída em meio Muller Hinton caldo. Para agilizar os ensaios, utilizou-se uma pipeta multicanal da marca Eppendorf.

Na sequência, as microplacas, já com o experimento montado, foram rapidamente introduzidas em jarras de anaerobiose e incubadas a 37° C por 48 horas.

Quanto a bactéria *S. epidermidis*, os ensaios foram os mesmos, porém as placas foram apenas incubadas diretamente em estufa a 37° C/ 4 horas.

Os valores de CIM, ou seja, a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento do micro-organismo visivelmente após a incubação foram lidos adicionando 50 µL de resazurina (0,01%) em cada poço e a mudança de cor de azul para rosa foi indicativa de crescimento e presença de células bacterianas viáveis.). Para os valores de CBM foram preparadas sub-culturas em placas de Petri contendo RCA para o *C. acnes* e BHI para o *S. epidermidis* para cada grupo de bactéria e obtenção de valores de CBM.

A CBM consiste em verificar a concentração com capacidade de provocar a morte bacteriana. A partir dos resultados obtidos no CIM. Após a verificação dos valores de CIM, utilizaram-se alças calibradas de 10 µL para semear material diretamente dos well das microplacas em placas de Petri contendo RCA para *C. acnes* e BHI Agar para *S. epidermidis*, sendo utilizados os poços a partir daquele em que não houve mais crescimento bacteriano, ou seja, a partir do poço marcado em azul (ausência de crescimento) pela resazurina, indicando inibição ou morte da *C. acnes* e *S. epidermidis* (quando aplicado). Essas placas foram incubadas em estufa também sob as condições previamente mencionadas para *C. acnes* e *S. epidermidis*, respectivamente.

A cada nova placa preparada, eram adicionados controles do meio, da bactéria a ser testada, do produto e o fármaco padrão (clindamicina).

Destacamos também que após a preparação das nanoemulsões, testes preliminares de triagem foram realizados com todas as 10 formulações com o objetivo de identificar se elas possuíam ou não atividade antimicrobiana. Para este caso especificamente, o CIM possuía concentrações de 13.092,96 até 3,19 µg/mL. Apenas a cepa ATCC 11828 de *C. acnes* foi utilizada neste experimento.

4.6.2 Disco Difusão:

Esta análise microbiológica consiste no método de Kirby-Bauer de difusão em disco, cujos compostos teste são adicionados a discos de papel de filtro inertes sendo em seguida aplicados sobre placas contendo a bactéria semeada. O ensaio foi realizado em duplicata.

As cepas de *C. acnes* ATCC 6919, 11828 e 11827 padronizadas na escala 0,5 de MacFarland foram semeadas em placas de RCM utilizando swabs estéreis, em seguida adicionou-se os discos de papel contendo respectivamente 10 µL de óleo essencial e geraniol e 15 µL de nanoemulsão de OE3 e nanoemulsão de G3 e da nanoemulsão OE3 +AgNP e nanoemulsão G3+ AgNP por disco. Essas placas foram incubadas em atmosfera de anaerobiose a 37 °C/48 horas. A leitura foi a padrão para o método do Kirby Bauer, ou seja, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm).

Discos comerciais de clindamicina com 2 µg foram aplicados, uma vez que é considerado o fármaco padrão utilizada no tratamento da acne.

4.6.3 Curva de Sobrevivência (ou *Time Kill Curve*)

A curva de sobrevivência, ou *Time Kill Curve*, foi realizada para identificar interações sinérgicas entre os compostos (OE e geraniol) e respectivas nanoemulsões preparadas com fármaco antimicrobiano clindamicina, de acordo com as diretrizes do Comitê Nacional para Padrões de Laboratório Clínico (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI, 2012).

Após a realização dos ensaios de microdiluição para obtenção dos valores de valores de CIM e CBM, a cepa escolhida para a realização do teste foi a *C. acnes* cepa ATCC 6919 por apresentar os resultados menos satisfatórios durante os ensaios anteriores.

Uma proporção 10^5 UFC / mL foi incubada em meio RCM em placas de 24 poços de fundo chato seja os compostos isolados (OE, geraniol, nanoemulsão de OE e nanoemulsão de geraniol e clindamicina nos respectivos valores do CIM) e também em misturas entre os produtos e a clindamicina em proporções correspondentes a 25% dos valores de CIM. A metodologia prevê uso de valores de CIM_{90%} para os compostos antimicrobianos isoladamente bem como a combinação dos respectivos compostos nas proporções de $\frac{1}{4}$ de CIM. Após inoculação e incubação da cepa de *C. acnes*, alíquotas dos cultivos foram tomadas nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 48 horas, com as quais foram realizadas sub-culturas em RCA e incubação sob anaerobiose em 37 °C/48 horas. Após final de crescimento das sub-culturas, foram realizadas as contagens de colônias, com auxílio de contador de colônias digital da marca Phoenix e obtidos dos valores de Log de UFC/mL. Desta forma, com os valores de Log UFC/ml foram preparados os respectivos gráficos para visualização dos efeitos sinérgicos nas combinações dos produtos testados e se tal interação sinérgica se deu por efeito bactericida ou bacteriostático.

O sinergismo e antagonismo foram definidos como uma diminuição ou aumento de 2-log_{10} , respectivamente, na contagem de colônias em 48 horas. Além disto, quando houve redução de $\geq 3\text{-log}_{10}$ UFC/mL a partir do inóculo inicial, este efeito é considerado bactericida (DOSLER et al., 2015).

Os compostos testados no ensaio da curva de sobrevivência encontram-se enumerados abaixo. Ao serem adicionados a placa de 24 poços, eles seguiram essa ordem.

- 1-Controle Bacteria 6919;
- 2-MIC OE (5000 µg/mL);
- 3-MIC G (5000 µg /mL);
- 4-MIC OE3 (1250 µg/mL);
- 5-MIC G3 (1250 µg/mL);
- 6-MIC CLINDAMICINA (39,06 µg/mL);
- 7-25%MIC OE + 25% MIC CLINDA;
- 8-25%MIC G + 25%MIC CLINDA;
- 9-25%MIC OE3 +25% MIC CLINDA
- 10-25% MIC G3 + 25% MIC CLINDA

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) não paramétrica por meio do teste de Kruskal-Wallis e as comparações múltiplas das médias das concentrações de antimicrobianos por meio dos testes *Student Newman-Keuls* e *Kruskal-Wallis* com nível de significância de 5% para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) dos antimicrobianos sobre as cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) da bactéria *Cutibacterium acnes* (ATCC11827, 11828 e 6919) e do *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228 e 35984). O software utilizado foi o software R versão 3.4.3 e Microsoft Excel 2016.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

5.1 Análise do óleo essencial da palmarosa por CG/DIC

A separação e quantificação das substâncias em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG-DIC) apresentou o seguinte cromatograma (Figura 7) com seus picos principais (Tabela 2) e os percentuais para cada composto. O maior pico visualizado refere-se ao composto geraniol e seu segundo maior pico (embora bastante inferior ao primeiro) representa o acetato de geranila. Estudos de caracterização anteriores trazem essa informação, com destaque para Thakker et al., de 2016 que demonstrou que o óleo essencial da Palmarosa contém principalmente geraniol (70 – 80%) e acetato de geranila. Prashar et al. (2003) identificaram geraniol (65%) e acetato de geranila (20%) como os principais compostos do óleo da palmarosa. Rao et al. (2004) realizaram também cromatografia gasosa após testar diferentes métodos de extração do óleo essencial de flores da palmarosa. Ele identificou o geraniol como sendo o composto majoritário. Scherer et al. (2009) realizaram análises para identificar a composição de óleos essenciais do gênero *Cymbopogon*, dentre eles a palmarosa (*Cymbopogon martinii*) comprovou que o geraniol compõe 80% do OE da palmarosa.

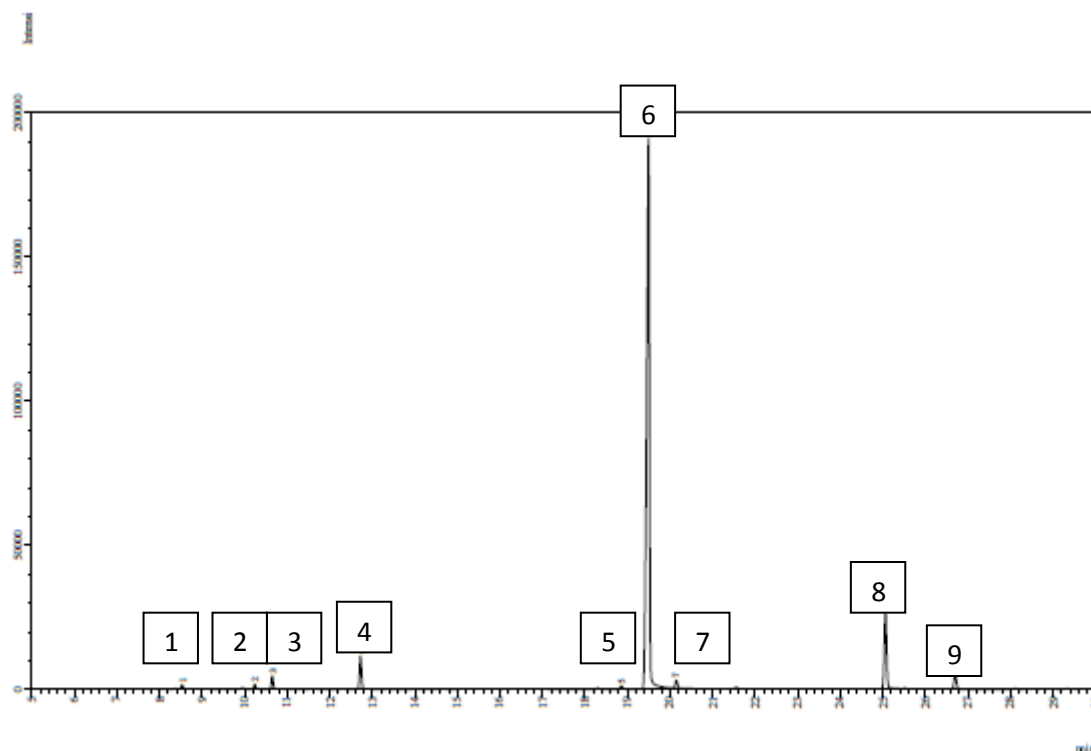


Figura 7. Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (GC/DIC) do óleo essencial de palmarosa.

Tabela 2. Composição química (%) do óleo essencial de palmarosa (*Cymbopogon martinii*).

Pico	Substância	IR calc	IR lit	% relativa
1	Mirceno	986	988	0,44
2	(Z)- β -ocimeno	1032	1032	0,44
3	(E)- β -ocimeno	1043	1044	1,30
4	Linalol	1095	1095	3,41
5	Neral	1235	1235	0,37
6	Geraniol	1253	1249	81,05
7	Geranial	1265	1264	0,89
8	Acetato de geranila	1378	1378	9,85
9	(E)-Cariofileno	1413	1417	1,83
10	N.I.	1744	-	0,40
Total identificado		-	-	99,60

IR_{calc} = índice de retenção experimental; IR_{lit} = índice de retenção de literatura (Adams, 2017); N.I.= não identificado.

5.2 Testes preliminares de estabilidade físico-química das nanoemulsões

O estudo de estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade. Os testes de estabilidade são considerados um procedimento preditivo, baseado em dados obtidos de produtos armazenados em condições que visam acelerar alterações passíveis de ocorrer nas condições de mercado. Como em todo procedimento preditivo os resultados não são absolutos, mas têm probabilidade de sucesso. A sequência sugerida de estudos (preliminares, acelerados e de prateleira) tem por objetivo avaliar a formulação em etapas, buscando indícios que levem a conclusões sobre sua estabilidade. O chamado teste de estabilidade preliminar tem como objetivo auxiliar e orientar na escolha das formulações, o desenvolvimento e inovação do produto, utilizando-se diferentes formulações de laboratório e com duração reduzida. Emprega condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características específicas de cada tipo de produto. Devido às condições em que é conduzido, este tipo de teste não tem a finalidade de estimar a vida útil do produto, mas sim de auxiliar na triagem das formulações ao longo da produção, antes de atingir o produto final (ANVISA, 2004). Nesta perspectiva a estabilidade preliminar das formulações foi analisada por meio das características organolépticas (aspecto, odor, opacidade/translucidez), valor de pH, condutividade elétrica, viscosidade, densidade, teste de centrifugação e estresse térmico. As formulações selecionadas para a continuidade do trabalho foram avaliadas quanto ao tamanho dos glóbulos, índice de polidispersidade, potencial zeta e espectroscopia na região do infravermelho médio.

5.2.1 Preparação

A estabilidade das emulsões depende intrinsecamente da interação interfásica estabelecida pelo agente emulsivo, composto anfifílico, entre as fases imiscíveis que as constituem. A escolha, proporção e a característica do tensoativo a ser utilizado na preparação da emulsão almejada, são previstas por meio da verificação dos valores do chamado equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) das substâncias envolvidas. EHL significa o balanço entre as duas porções moleculares com características opostas de uma substância. É ele que permite prever o tipo de comportamento esperado do composto frente a substâncias polares ou

apolares. Os tensoativos devem apresentar valor de EHL equivalente ao da fase dispersa, para poder mantê-la estabilizada frente à fase dispersante. Para determinar o valor de EHL pode-se recorrer a dados em literatura ou equações baseadas na fórmula molecular do composto. Entretanto, quando o EHL de uma substância específica é desconhecido ou a literatura cita em ampla faixa de valor, torna-se útil ensaiar o preparo de emulsões com o óleo cujo EHL deve ser determinado, utilizando-se de tensoativos de EHL conhecidos (ZANIN et al.,2002). Assim foi realizado no atual estudo, onde o óleo essencial e o composto majoritário não tinham valores de EHL definidos, mas ambos os surfactantes sim, conforme a tabela 3.

Este sistema foi introduzido por Griffin em 1949 como uma escala numérica adimensional de valores entre 1 e 20 que é usada para descrever a natureza do agente tensoativo, sendo que os valores de EHL aumentam de acordo com a hidrofília da molécula. O equilíbrio hidrófilolipófilo de um tensoativo é uma propriedade importante no processo de emulsificação, posto que determina o tipo de emulsão que tende a produzir. Agentes emulsivos de EHL baixo tendem a formar emulsões água/óleo, ao passo que aqueles com EHL alto formam emulsões óleo/água. Portanto, o conhecimento dos valores de EHL permite prever o tipo de comportamento esperado do composto, fornecendo desta forma orientação para suas aplicações práticas (ZANIN et al.,2002).

Tabela 3. Valores de EHL para os surfactantes utilizados.

Tensoativo	Valor de EHL	Hidrofílico ou Lipofílico
Tween 20	16,7	Hidrofílico
Span 80	4,3	Lipofílico

Os valores de EHL dos surfactantes mistos são um fator chave na formação das gotículas (ou micelas) de uma emulsão. Durante a formação de uma emulsão óleo em água (O/A), como as que foram preparadas para geraniol e óleo de palmarosa, os surfactantes lipofílicos têm maior afinidade com as gotículas de óleo dispersas na emulsão do que o surfactante hidrofílico. Um valor adequado de EHL é importante para manter o equilíbrio das fases de óleo e água. Com um valor ideal de EHL, as gotículas recém-formadas são estabilizadas durante a emulsificação e seu tamanho de gota é mantido. As emulsões apresentaram aspecto opaco e branco-leitoso com valores de EHL de 6,78 e 11,74 e transparentes ou translúcidas nos valores de EHL entre 8,02 e 10,5 (tabela 4). Estudos indicaram que o tamanho das gotículas de uma emulsão tem efeito significativo sobre a

eficiência do encapsulamento de materiais em seu núcleo. Reduzindo o tamanho da gota de emulsão pode-se ter maior retenção de componentes encapsulados em sistemas emulsionados. A maior retenção de óleos essenciais em pequenas gotas de emulsão está relacionada à redução do diâmetro médio do volume superficial o que pode melhorar a modificação da organização da interface esférica e aumentar a área interfacial que guia a quebra de compostos aromáticos em emulsões (WEN-CHIEN LU et al.,2018).

Tabela 4. Composição das nanoemulsões preparadas com o óleo essencial (formulações com a sigla OE) e geraniol (formulações G).

AMOSTRAS	Siglas	Fase oleosa % m/m	Tween 20 % m/m	Span80 % m/m	EHL	Água % m/m
1	G1 e OE1	1,5	1,0	4,0	6,78	93,5
2	G2 e OE2	1,5	1,5	3,5	8,02	93,5
3	G3 e OE3	1,5	2,0	3,0	9,26	93,5
4	G4 e OE4	1,5	2,5	2,5	10,50	93,5
5	G5 e OE5	1,5	3,0	2,0	11,74	93,5

5.2.2 Valor de pH

Segundo a ANVISA (2004), a determinação da faixa de pH de uma formulação deve contemplar os aspectos de estabilidade dos ingredientes, segurança e eficácia do produto.

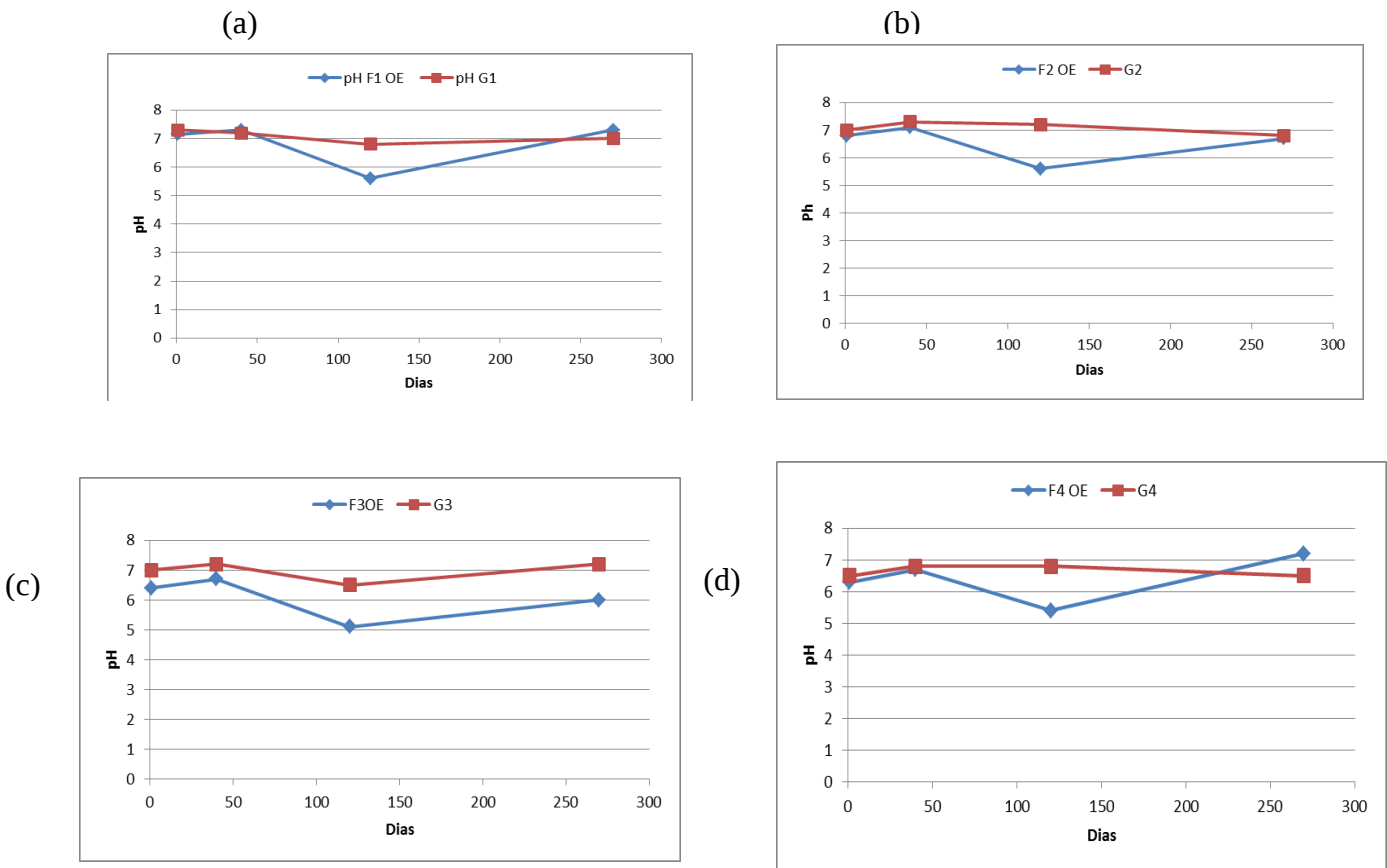
A tabela 5 trás os valores de pH, logo após a preparação das nanoemulsões. As formulações destinadas ao uso tópico devem possuir valor de pH próximo ao da pele (4,0 á 7,0) a fim de evitar alterações fisiológicas que possam comprometer sua integridade (OLIVEIRA, 2008).

Tabela 5: Avaliação do valor de pH das nanoemulsões de palmarosa (OE1 a OE5) e das nanoemulsões de geraniol (G1 A G5) em diferentes tempos de preparação. A leitura foi realizada a temperatura ambiente de 25°C.

Formulação	pH
OE1	7,1
OE2	6,8
OE3	6,4
OE4	6,3
OE5	6,0
G1	7,3
G2	7,0
G3	7,0
G4	6,5
G5	6,6

Os valores de pH das nanoemulsões foram avaliados nas amostras recém-preparadas e após armazenamento a 25°C± 2 após 40, 120 e 270 dias. As medições estão expressas na figura 8, representando as proporções de surfactantes para as amostras com óleo essencial e geraniol referentes a Tabela 4.

Os valores de pH mostraram-se constantes entre 6,0 e 7,0 para a maioria das análises, com exceção da leitura realizada após 120 dias para as amostras contendo óleo essencial (valores de pH aferidos entre 5,1 e 5,6). Ao delinear uma formulação de um produto cosmético para administração dérmica, deve-se considerar que a pele secreta substâncias com importante capacidade tamponante, tolerando formulações com pH entre 3 e 9 (LIMA, 2013).



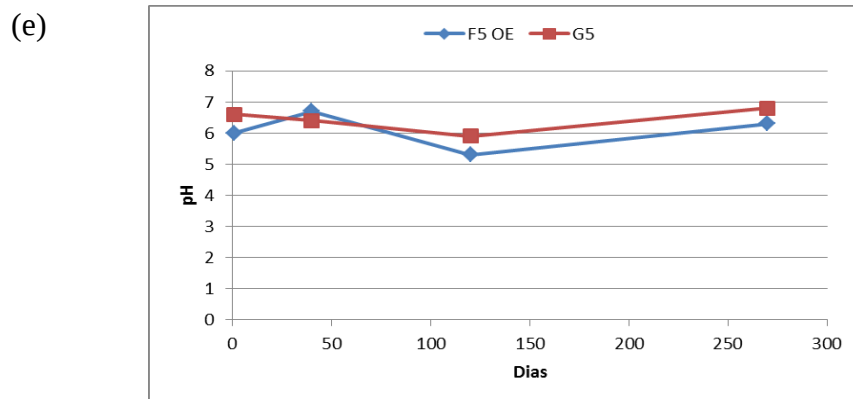


Figura 8. Valores de pH medidos no intervalo de tempo de 0, 40, 120 e 270 dias para as formulações de óleo essencial de palmarosa (OE) e geraniol (G) nas condições de EHL 6,78 (OE1 e G1) (A), 8,02 (OE2 e G2) (B), 9,26 (OE3 e G3) (C), 10,50 (OE4 e G4) (D) e 11,74 (OE5 e G5) (E).

Oliveira (2008) avaliou os valores de pH para três formulações de nanoemulsões do tipo O/A em um período de 30 dias sob diferentes condições de temperaturas. As formulações foram delineadas para o preparo de nanoemulsões contendo óleo essencial de andiroba ou copaíba, bem como uma mistura da fase oleosa. O autor utilizou mais de um tensoativo em diferentes proporções, sendo eles principalmente Tween80, Span80 e Ultroil. Em relação aos valores de pH, as três formulações obtiveram resultados semelhantes, com leve diminuição não significativa em 30 dias nas temperaturas de 4 e 25°C, apresentando valores entre 4,01 e 4,40 para as preparações com andiroba, entre 7,93 e 8,29 para aquelas contendo copaíba e entre 5,84 e 5,96 quando os dois compostos naturais estavam juntos na mesma nanoemulsão. Sob condições de temperatura de 45°C todas as formulações apresentaram decréscimo no valor do pH, porém, esta variação não foi estatisticamente significativa para nenhuma das amostras analisadas. As alterações no valor do pH podem ser decorrentes de processos oxidativos dos componentes da formulação, principalmente da fase oleosa, como os óleos vegetais, que são passíveis de auto oxidação quando expostos ao oxigênio atmosférico ou a altas temperaturas formando hidroperóxidos ou mesmo ocorrendo a hidrólise de triglicerídeos levando à formação de ácidos graxos, sendo que os ácidos graxos livres reduzem o pH da formulação. (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001, AULTON, 2005, MASMOUDI et al, 2005). Segundo Ramalho, (2006) as reações oxidativas são responsáveis pelo desenvolvimento de odores desagradáveis e outras alterações que comprometem a integridade

e segurança dos produtos, tornando-os impróprios e fatores como incidência de luz, temperaturas elevadas podem acelerar o processo de oxidação.

Pereira (2011) também avaliou valores de pH em função do tempo e da temperatura para suas nanoemulsões O/A compostas por óleos de framboesa, maracujá e pêssego. Suas formulações apresentaram valores de pH compatíveis com a pele, porém levemente ácidos, entre 4,6 e 5,8. Quando submetidas ao teste de estabilidade, a valor de pH das amostras apresentou diferenças estatisticamente significativas quando armazenadas a $50 \pm 2^\circ\text{C}$ após longo período de dias (70 dias). Reações oxidativas possivelmente ocorreram neste caso, baixando os valores de pH para números inferiores a 4,0.

O valor de pH foi novamente avaliado após a realização do teste de estresse térmico. As medições foram realizadas em triplicata, após diluição (tabela 6). Os valores de pH permaneceram entre 6,0 e 7,0 como na medição inicial, antes do estresse por temperatura. Porém este teste não foi realizado como nos estudos anteriormente citados, que realizaram avaliações de estabilidade a longo prazo em diferentes temperaturas. As formulações passaram por medições de pH após os testes que seguiram as especificações do teste do estresse térmico, ou seja, permaneceram 30 minutos sob temperaturas entre 40°C e 80°C .

Tabela 6. Avaliação do pH das nanoemulsões de palmarosa e das nanoemulsões de geraniol após teste do estresse térmico a 80°C .

Formulação	pH
OE1	6,7
OE2	7,1
OE3	6,5
OE4	6,5
OE5	6,1
G1	7,3
G2	7,2
G3	7,0
G4	6,9
G5	6,7

5.2.3 Condutividade

Utilizada para a medida da passagem da corrente elétrica, no meio avaliado, alterações na condutividade elétrica de sistemas dispersos pode ser indicativo de instabilidades. O aumento da condutividade pode estar relacionado com a coalescência; enquanto a diminuição, com a agregação (ANVISA, 2004). Os valores de condutividade elétrica das nanoemulsões

foram avaliados nas amostras recém-preparadas e após armazenamento a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ após 40, 120 e 270 dias. A figura 9 expressa esses dados.

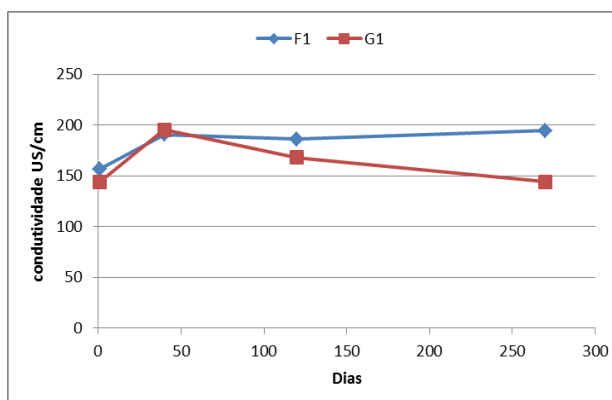
As formulações de número 5, tanto para a nanoemulsão de óleo essencial quanto para a de geraniol, apresentaram menores valores de condutividade elétrica em relação as demais, sendo estas as formulações mais viscosas e opacas, além de ter ocorrido separação de fases após aproximadamente 6 meses de preparação, provavelmente ocorreu agregação de seus componentes o que desestabilizou o preparado.

Geralmente a fase aquosa da emulsão possui alguma concentração de eletrólito e a fase oleosa não, a condutividade elétrica torna-se então uma propriedade importante a ser determinada, podendo ser utilizada até mesmo para detectar o tipo de emulsão. Como aproximação, pode-se dizer que a condutividade elétrica de uma emulsão é proporcional à condutividade de sua fase contínua e a sua fração volumétrica. A variação de condutividade depende também da média e da distribuição de tamanhos de gota, porém não é muito sensível a estes parâmetros, a menos que ocorra grandes mudanças em suas características. Isso significa dizer que a condutividade de uma emulsão varia com a proporção de sua fase contínua. A condutividade de emulsões A/O é bem menor que as de O/A, o que era de se esperar já que a condutividade elétrica da fase óleo pode ser de 100 à 1000 vezes menor que a condutividade da fase aquosa. Consequentemente, o ponto onde a emulsão inverte de fase – ou muda de tipo – corresponde a uma grande mudança na condutividade (SALAGER, 2000). A nanoemulsão do atual estudo é do tipo óleo em água (O/A), sendo a água a fase contínua ou dispersante há maior tendência de ocorrer condutividade elétrica nessa fase devido a polaridade da maior parte das moléculas constituintes.

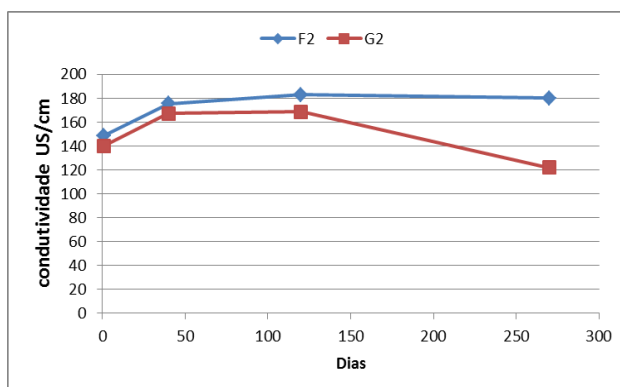
Masmoudi et al. (2005) relataram que é difícil avaliar a estabilidade de emulsões somente pela condutividade elétrica, porque não há uma relação linear entre o aumento da condutividade e o fenômeno de instabilidade.

Pereira (2011) não observou alterações significativas na condutividade durante aproximadamente 100 dias de teste, nas temperaturas de 5°C e 25°C . Apenas no 60º dia, a 50°C ocorreu aumento significativo da condutividade elétrica.

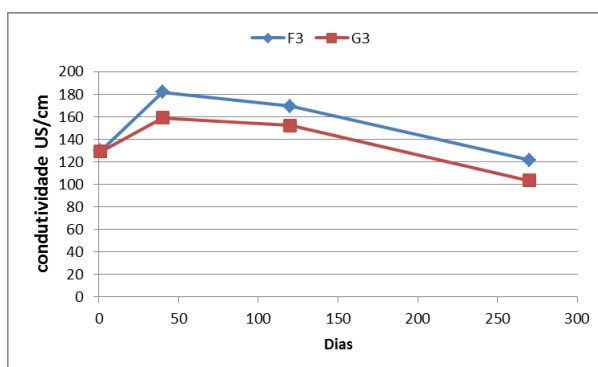
(a)



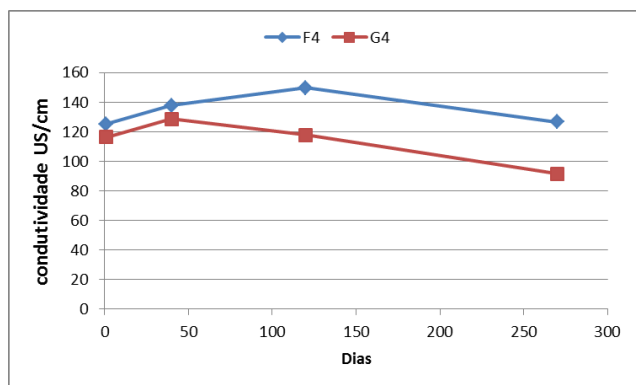
(b)



(c)



(d)



(e)

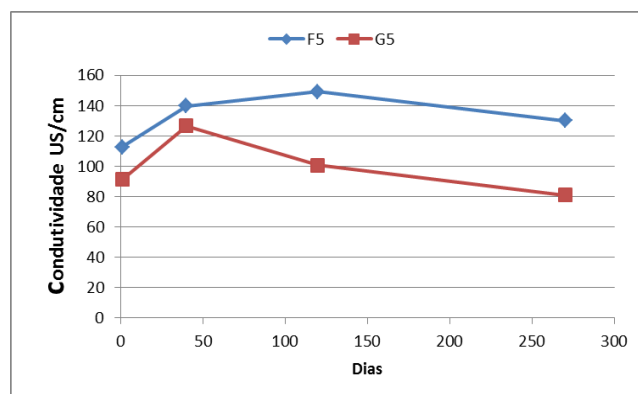


Figura 9: Valores de condutividade elétrica medidos no intervalo de tempo de 0, 40, 120 e 270 dias para as formulações de óleo essencial de palmarosa (OE) e geraniol (G) nas condições de EHL 6,78 (OE1 e G1) (A), 8,02 (OE2 e G2) (B), 9,26 (OE3 e G3) (C), 10,50 (OE4 e G4) (D) e 11,74 (OE5 e G5) (E).

A Tabela 11 do item “viscosidade”, traz valores de EHL e viscosidade média. Fazendo-se uma correlação, pode ser observado que a condutividade parece diminuir conforme a viscosidade aumenta (EHL também aumenta). A viscosidade aumenta na

sequencia das formulações 1 para 5, tanto para óleo essencial quanto para geraniol, interferindo nas interações moleculares e assim atrapalhando a condutividade elétrica.

5.2.4 Densidade

A densidade é a representada pela relação entre a massa de uma substância e o volume que ela ocupa e, geralmente para os líquidos, é determinada empregando-se picnômetro ou densímetro. No caso de líquidos ou semi-sólidos este parâmetro pode indicar a incorporação de ar ou a perda de ingredientes voláteis. A luz ultravioleta, juntamente com o oxigênio, origina a formação de radicais livres e desencadeia reações de óxido-redução. Os produtos sensíveis à ação da luz devem ser acondicionados ao abrigo dela, em frascos opacos ou escuros e devem ser adicionadas substâncias antioxidantes na formulação, a fim de retardar o processo oxidativo. Para a determinação da densidade (aparente) de pós utilizam-se proveta e balança. A densidade aparente está relacionada à capacidade do recipiente. É importante evitar o transbordamento ou a aparente falta de produto no recipiente que o contém, pois o peso declarado poderá estar dentro dos limites especificados, mas o consumidor terá a sensação de “falta de produto” (ANVISA, 2004). Todos os valores ficaram próximos a 1, conforme a tabela 7.

As nanoemulsões contém em sua composição 93,5% de água que possui densidade de aproximadamente 1,00 ($0,997\text{g/cm}^3$). Apesar de estarem em menor proporção, os surfactantes Tween 20 e Span 80 também possuem densidades próximas a 1, sendo $1,1\text{ g/cm}^3$ e $1,0\text{ g/cm}^3$ respectivamente. A densidade do óleo essencial fica em torno de $0,874\text{ g/cm}^3$ e do geraniol é de $0,879\text{ g/cm}^3$.

Tabela 7. Medidas de densidade de cada formulação de nanoemulsão. OE1 á OE5 representam as nanoemulsão preparadas com o óleo essencial de palmarosa e as formulações chamadas de G1 á G5, são nanoemulsões de geraniol.

FORMULAÇÃO	DENSIDADE (g/cm ³)
OE1	0,995
OE2	1,002
OE3	0,999
OE4	0,992
OE5	0,996
G1	1,002
G2	0,994
G3	0,999
G4	1,000
G5	0,981

5.2.5 Teste de centrifugação

Antes de iniciar qualquer estudo de estabilidade, recomenda-se submeter o produto ao teste de centrifugação. Sugere-se centrifugar uma amostra a 3.000 G durante 30 minutos. O produto deve permanecer estável e qualquer sinal de instabilidade indica a necessidade de reformulação. Se aprovado nesse teste, o produto pode dar sequência aos testes de estabilidade. A força da gravidade atua sobre a amostra fazendo com que suas partículas se movam no seu interior. O teste de centrifugação produz estresse na amostra simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades. Estas poderão ser observadas na forma de precipitação, separação de fases, formação de *cakin* (ou formação de sedimento não redispersível), coalescência, entre outras. Esses fenômenos podem ser detectados em condições normais de armazenamento e podem ser avaliados em menor tempo e acelerados pela centrifugação. A amostra é centrifugada em temperatura, tempo e velocidade padronizados. Em seguida avalia-se visualmente a amostra (ANVISA, 2004).

A análise visual das amostras está expressa na tabela 8. Seguindo os parâmetros determinados pela ANVISA (2004), as formulações de nanoemulsões de número 5 (com EHL=11,74) não seriam apropriadas para continuarem possíveis testes cosméticos. Quando

centrifugadas por 30 minutos a 1800 G já apresentaram separação leve de fase no fundo do tubo. Quando submetidas a 3000 G, separaram-se ainda mais, embora tenha sido uma separação discreta, essas formulações não retornavam a seu estado homogêneo após agitação.

Oliveira (2008) submeteu as nanoemulsões somente a centrifugação a 3000 G por 30 minutos, conforme as orientações da Anvisa, e suas três formulações foram estáveis. Neste estudo, as nanoemulsões eram compostas pelo óleo de andiroba, copaíba e ambos juntos. A emulsão com óleo de andiroba apresentava também Span80 (1,15%), água (80%) e Ultroil R400 (3,85%), outro surfactante. E a formulação com óleo de copaíba continha 5% de Tween 80 e 85 % de água, ou seja, formulações semelhantes as formulações para o óleo essencial de palmarosa e o geraniol, que também possuem 5% de surfactantes e 90% de água.

Nos estudos de Pereira (2011), nanoemulsões O/A preparadas com vários tensoativos incluindo, Tween 20 e Span 80, e óleos vegetais foram centrifugadas em três velocidades durante 15 minutos: 1000 G, 2500 G e 3500 G. As formulações foram estáveis em todas as velocidades, sem separação de fases ou qualquer outro fenômeno de quebra da emulsão. Pode-se observar aqui, que quanto maior a combinação de tensoativos utilizados, maior a estabilidade do preparado.

A força da gravidade atua sobre os glóbulos das emulsões acarretando cremação ou sedimentação, processos estes que aumentam as interações entre os glóbulos da fase dispersa, causando floculação, coalescência e posterior separação de fases. Este processo é tanto mais rápido quanto maior for a fragilidade do sistema (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG; 2001; BECHER, 2001).

Os glóbulos dispersos em meio fluido devido ao movimento browniano podem se chocar. Dependendo das forças de interação entre os glóbulos, atração e repulsão, e da natureza da sua superfície estas colisões resultam em uma união permanente, ou em um afastamento que as manterão livres no meio (FLORENCE & ATTWOOD, 2003). O teste de centrifugação aumenta a colisão entre os glóbulos, permitindo prever de forma rápida a estabilidade da emulsão (BECHER, 2001).

Tabela 8. Medidas do teste de centrifugação de cada formulação de nanoemulsão. OE1 á OE5 representam as nanoemulsão preparadas com o óleo essencial de palmarosa e as formulações chamadas de G1 a G5, são nanoemulsões de geraniol.

FORMULAÇÃO	ROTAÇÕES POR MINUTO (RPM)		
	980	1800	3000
OE1	S.A*	S.A	S.A.
OE2	S.A.	S.A	S.A.
OE3	S.A	S.A	S.A.
OE4	S.A	S.A	S.A.
OE5	S.A	S.L.**	S.I.***
G1	S.A	S.A	S.A.
G2	S.A	S.A	S.A.
G3	S.A	S.A	S.A.
G4	S.A	S.A.	S.A
G5	S.A	S.L.	S.I

*S.A.: sem alterações, não houve separação de fases;**S.L.: separação de fases leve. Ao agitar o conteúdo volta a formar uma solução homogênea e permanece assim;***S.I.: separação de fases intensa, não volta a formar solução homogênea após agitação.

5.2.6 Estresse térmico

Os resultados indicaram uma estabilidade das formulações até a temperatura de 70°C. Acima de 75°C, as formulações OE5 de óleo essencial e G5 do geraniol apresentaram-se levemente modificadas em relação ao aspecto macroscópico, com minúsculos glóbulos amarelados e em pequena quantidade. Sob condições de temperatura de 80°C mais formulações apresentaram instabilidade e leves alterações, porém sem separação de fases completa.

O teste de estresse térmico proposto por Braconi *et al.* (1995) emprega a temperatura como condição de tensão sobre a formulação. Segundo Oliveira (2008), as três formulações, compostas por óleo de andiroba, óleo de copaíba, Span 80 e Tween 80, Ultroil R400 e 80% de água em diferentes proporções, quando submetidas ao teste de estresse térmico, não apresentaram sinais de instabilidade macroscópica até a temperatura de 75°C, pelo período de 30 minutos.

O aumento da temperatura pode ocasionar aumento da velocidade de cremeação, devido à diminuição da viscosidade aparente da fase contínua, bem como ocasionar o

aumento da motilidade cinética, tanto da fase dispersa quanto do tensoativos na interface da emulsão, favorecendo a coalescência (PEREIRA, 2011).

Pereira (2011) obteve como resultado para o teste do estresse térmico que todas as amostras mostraram-se estáveis até à temperatura de 50°C, valor máximo de temperatura preconizado pela ANVISA (2004), para realização de testes de estabilidade. A partir de 60°C algumas amostras apresentaram leves modificações porém outras chegaram a atingir os 80°C estáveis.

Portanto, os resultados do atual estudo estão de acordo com o estabelecido pela Anvisa (2004) para a avaliação da estabilidade de produtos cosméticos.

Tabela 9. Análise do estresse térmico para cada formulação de nanoemulsão. OE1 á OE5 representam as nanoemulsão preparadas com o óleo essencial de palmarosa e as formulações chamadas de G1 a G5, são nanoemulsões de geraniol.

TEMPERATURA (°C)	FORMULAÇÕES									
	OE1	OE2	OE3	OE4	OE5	G1	G2	G3	G4	G5
25	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
30	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
35	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
40	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
45	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
50	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
55	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
60	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
65	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
70	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
75	NR	NR	NR	NR	LM	NR	NR	NR	NR	LM
80	NR	NR	NR	NR	LM	LM	NR	LM	LM	LM

NR: sem alterações e homogêneo ; LM: levemente modificado sem separação de fases e SF: não homogêneo, com separação de fases.

5.2.7 Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (ATR-FTIR)

Quase todos os compostos que tenham ligações covalentes, sejam orgânicos ou inorgânicos, absorvem várias frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho do espectro eletromagnético. Poppi e de Souza (2012) utilizaram a

espectroscopia de infravermelho médio, unida à análise de componentes principais, para avaliar óleos vegetais comestíveis. Segundo os autores, o uso de espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR) combinado com análise quimiométrica é constantemente explorado em estudos de reconhecimento de padrões de óleos vegetais comestíveis, na análise de parâmetros físico-químicos de qualidade e no estudo de autenticidade e adulteração desses óleos. A FTIR é uma técnica rápida, requer o mínimo necessário de preparo de amostras e sua instrumentação é facilmente encontrada nos laboratórios. Esta técnica permite a análise qualitativa de compostos orgânicos porque os modos característicos de vibração de cada grupo provocam o aparecimento de bandas no espectro infravermelho em frequências específicas, que também são influenciadas pela presença de grupos funcionais próximos (acoplamentos). Sendo assim, um espectro de infravermelho geralmente contém mais informação do que apenas os valores de posição ou de absorção de alguns picos, atuando como uma impressão digital de uma dada amostra quando utilizado integralmente. Além disso, a espectroscopia FTIR é uma excelente ferramenta para análise quantitativa porque as intensidades de absorção das bandas no espectro são proporcionais à concentração (RUSCHEL et al.,2014).

A espectroscopia de infravermelho foi utilizada para monitorar as mudanças ocorridas durante o processo de síntese.

As figuras 10 e 11 representam os espectros de absorção na região do infravermelho médio para as amostras de nanoemulsão G1e OE1. Sendo que os espectros para as demais formulações apresentaram um perfil igual.

A Tabela 10 apresenta as principais atribuições do espectro infravermelho para a maioria dos compostos orgânicos. As vibrações de estiramento de C=O (1734 cm^{-1}) e C-O (1172 cm^{-1}) foram indicadas nos espectros (PAVIA et al.,2010).

Tabela 10. Bandas de leitura FTIR-ATR.

Grupo Funcional	Comprimentos de Onda (cm^{-1})
OH	3400-3100
C-H alifáticos	2970-2920
C-H aromáticos	3080-3020
C=O	1800-1500
C=C	Abaixo de 1500
C-O	1000-870
C-C	760-500

Grupamentos OH que aparecem em um comprimento de onda de aproximadamente 3400 cm^{-1} representam os grupamentos das moléculas de água que compõem a nanoemulsão. Sua composição contém 93,5% de água, então essa banda já era esperada. O geraniol, além de compor composições de nanoemulsões, também é o composto majoritário do óleo essencial, assim era esperado que bandas que representem o grupamento OH estejam presentes em espectros de ambas as preparações. O geraniol é um monoterpene e também um álcool, por isso possui grupamentos hidroxila (OH).

Ainda há os surfactantes possuem grupamentos OH em sua composição. A região que fica em 1750 cm^{-1} refere-se ao estiramento de carbonilas do éster, que estão presentes nos surfactantes da família Tween. Tween-20 e Tween-80 são surfactantes polissorbatos com uma porção éster de ácido graxo e uma longa cadeia de polioxietileno. Uma questão comum sobre os detergentes da família Tween é a diferença entre Tween 20 e Tween 80.

O surfactante Tween 20 é um derivado etoxilado do ácido láurico, enquanto o Tween 80 do ácido oleico. O número 20, por exemplo, após a parte polioxietileno refere-se ao número total de grupos oxietileno - $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$ - encontrados na molécula (JOHNSON, 2013). As bandas na região de 1300 a 800 cm^{-1} indicam sobreposição de bandas presentes tanto no óleo quanto no éster correspondente, que neste caso poderia ser representado pelo acetato de geranila. Quando isso ocorre, entende-se que pode ter ocorrido uma reação de esterificação de moléculas de geraniol, que formaram o acetato de geranila e degradação da amostra (RUSCHEL *et al.*, 2014).

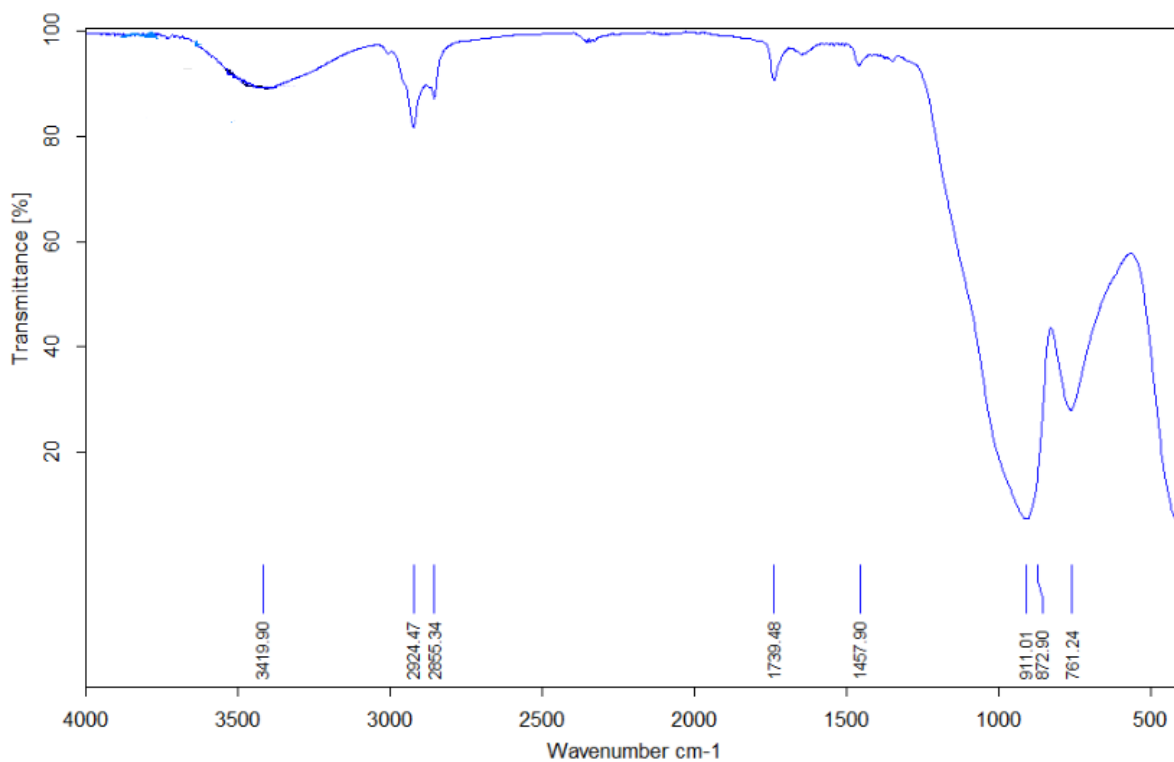


Figura 10. Espectro de ATR-FTIR referente a nanoemulsão G1.

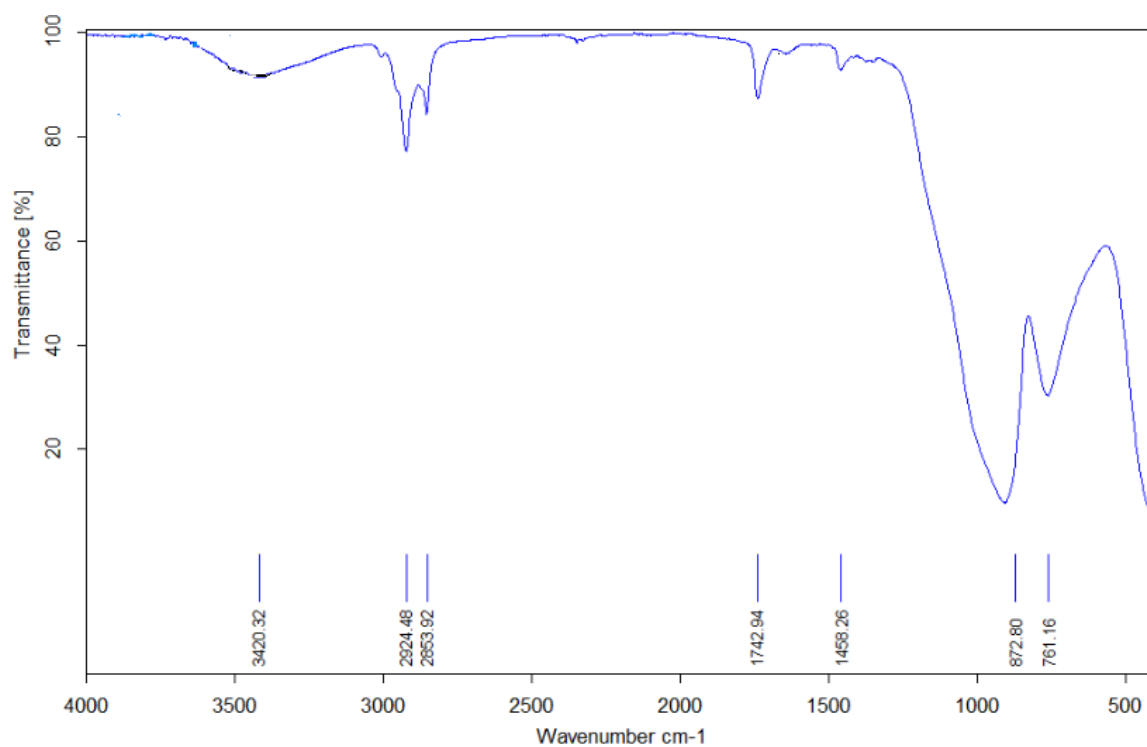


Figura 11. Espectro de ATR-FTIR referente a nanoemulsão de OE1.

No estudo de Worzakowska (2014) foram realizadas análises de FTIR e os resultados corroboram com os resultados encontrados para o atual estudo. Há bandas de estiramento vibracional C-H em torno de 3000 cm^{-1} ; C=O em 1700 cm^{-1} ; C=C em 1500 cm^{-1} , estiramento rotacional de C-H em 1300 cm^{-1} ; C-O em 1200 cm^{-1} e =C-H em 400 cm^{-1} . O gráfico não apresentou o pico para OH em 3400 cm^{-1} no estudo.

5.2.8 Viscosidade

A viscosidade é uma variável que caracteriza reologicamente um sistema. A avaliação desse parâmetro ajuda a determinar se um produto apresenta a consistência ou fluidez apropriada e pode indicar se a estabilidade é adequada, ou seja, fornece indicação do comportamento do produto ao longo do tempo (ANVISA, 2004).

A viscosidade foi medida em dois tempos, ou seja, imediatamente após a preparação das nanoemulsões e depois de 6 meses de seu preparo. Segundo Aulton (2005), o aumento da temperatura pode ocasionar aumento da velocidade de cremação, devido à diminuição da viscosidade aparente da fase contínua, bem como ocasionar o aumento da motilidade cinética, tanto da fase dispersa quanto do tensoativo na interface da emulsão, favorecendo a coalescência (PEREIRA, 2011).

A tabela 11 expressa as medições de viscosidade para as nanoemulsões deste estudo, mostrando que, conforme o aumento dos valores de EHL, os valores da viscosidade também foram aumentando. Visualmente as nanoemulsões eram mais opacas e esbranquiçadas principalmente nas formulações 1 e 5, tanto de geraniol quanto do óleo. Em relação ao tempo de armazenamento, pode-se notar que não há mudanças significativas.

Assunção (2016) testou a viscosidade de nanopartículas poliméricas em viscosímetro de Brookfield e obteve resultados entre 0,00292 e 0,00350 Pas.s, valores próximos aos da tabela 11. As nanopartículas também incluem Tween 20 em sua composição. Apesar de o estudo tratar de um nanocomposto diferente do atual, é possível comprovar que valores da viscosidade variaram com o EHL da mistura de tensoativos sempre que se trata de um nanocomposto e que são pouco viscosos.

Em nanoemulsão, quanto maior a viscosidade, maior é a estabilidade e tempo de vida útil da amostra para testes (PORTO, 2015). Observando a tabela 11 e a tabela 12, podemos notar que aquela que foi considerada a melhor composição (número 3) não possui o maior

valor de viscosidade, porém como os valores encontram-se próximos não interferiram na estabilidade do preparado.

Tabela 11. Análise da viscosidade das nanoemulsões de palmarosa e de geraniol, após o preparo e após 6 meses armazenadas a temperatura ambiente.

Formulação	Viscosidade Média (Pa.s)		
	Dia do preparo	Após 6 meses	EHL
G1	0,003565	0,004132	6,78
G2	0,003816	0,003498	8,02
G3	0,003639	0,003669	9,26
G4	0,004235	0,003882	10,5
G5	0,004255	0,004065	11,74
OE1	0,003539	0,03430	6,78
OE2	0,003504	0,03619	8,02
OE3	0,003605	0,03638	9,26
OE4	0,003772	0,004039	10,5
OE5	0,003822	0,004107	11,74

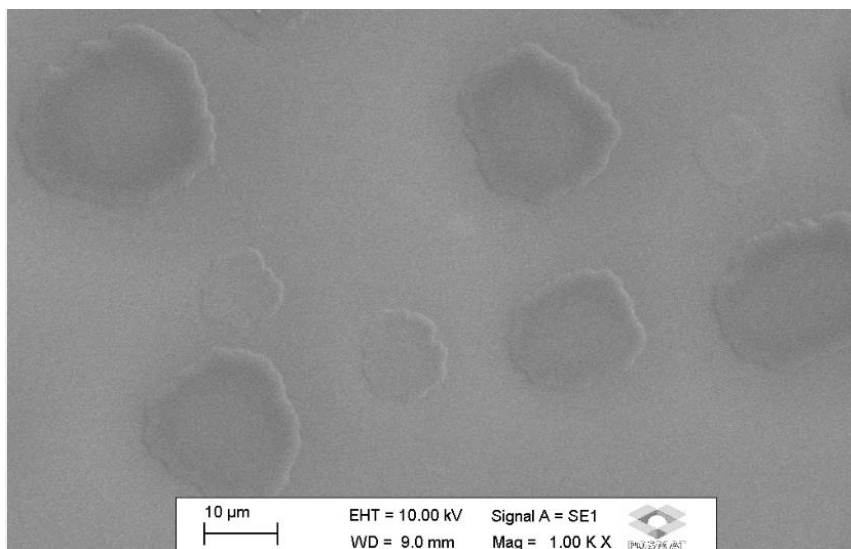
De uma forma geral, a viscosidade de um sistema emulsionado é proporcional à viscosidade de sua fase contínua. Outro fator que tem influência sobre a viscosidade de um sistema emulsionado é a fração de fase dispersa. Se as gotas dispersas são escassas, estas encontram-se distantes o suficiente para não interagirem entre si, e a única interação que ocorre é entre cada uma das gotas isoladas e o meio que as envolvem. Quando o número de gotas dispersas aumenta, as interações entre as gotas tornam-se predominantes e causam aumento na viscosidade da emulsão final. Ao considerarmos as gotas como esferas rígidas com tamanhos idênticos, o arranjo tridimensional mais denso é chamado de arranjo hexagonal compacto, que preenche 74% de espaço. Assim, no caso mais favorável possível, o valor máximo de viscosidade da fase dispersa é de 0,74, no qual a viscosidade seria infinita, porém isso só ocorreria em um sistema monodisperso. Entretanto, os sistemas emulsionados não são monodispersos, contendo uma distribuição de tamanho de gotas, de forma que gotas pequenas se alojam nos espaços entre as gotas maiores (SALAGER, 2000).

Uma emulsão pode ser considerada uma solução homogênea se a observarmos em grande escala (aproximadamente umas 100 ou 1000 vezes maior que seu tamanho de gotas), com propriedades reológicas constantes, haja visto que, não há mudanças nas características de uma emulsão quando esta é posta em movimento. Em outras palavras, as tensões mecânicas exercidas sobre emulsões estáveis durante as medidas de reologia não produzem mudanças em suas características. Porém, quando estas possuem 60-70% de fase dispersa se tornam fluidos pseudoplásticos e a viscosidade torna-se dependente da taxa de cisalhamento aplicada. Acima de 85-90% de fase dispersa, as emulsões não se comportam mais como fluidos simples e geralmente são descritas como viscoelásticas. Um terceiro fator a ser levado em consideração seria a distribuição de tamanhos de gota. Emulsões que contém gotas pequenas apresentam uma alta área superficial por unidade de volume, quando comparadas as que contém gotas maiores. Como o efeito de atrito entre as gotas está relacionado à área superficial, um aumento na viscosidade está associado a um decréscimo na média de tamanhos de gota (SALAGER, 2000).

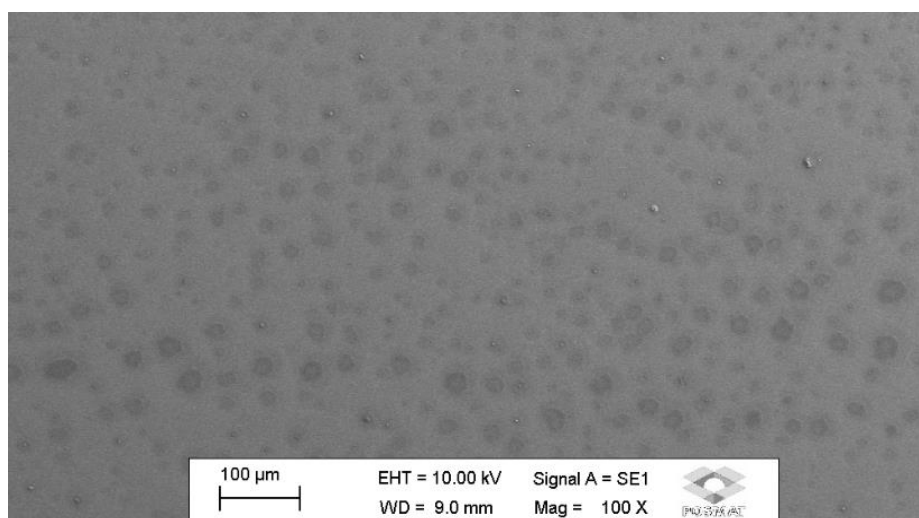
5.2.9 Microscopia eletrônica de varredura

As microscopias eletrônica de varredura (MEV) ou de transmissão (MET) têm sido muito empregadas na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho dos nanocompostos. A MET pode permitir também a diferenciação entre substâncias nanoestruturadas, possibilitando, por exemplo, a determinação da espessura da parede de nanocápsulas. Os métodos usuais para a determinação da distribuição de tamanho dos nanocompostos consistem em espectroscopia de correlação de fótons (potencial zeta) e MEV ou MET. Dependendo da formulação, podem ser verificadas diferenças de tamanho de partículas conforme o método empregado na sua determinação, uma vez que a microscopia eletrônica fornece uma imagem da partícula isolada do meio, enquanto a espectroscopia de correlação de fótons possibilita a determinação do raio hidrodinâmico das partículas em suspensão (SCHAFFAZICH et al.,2003).

A)



B)



C)

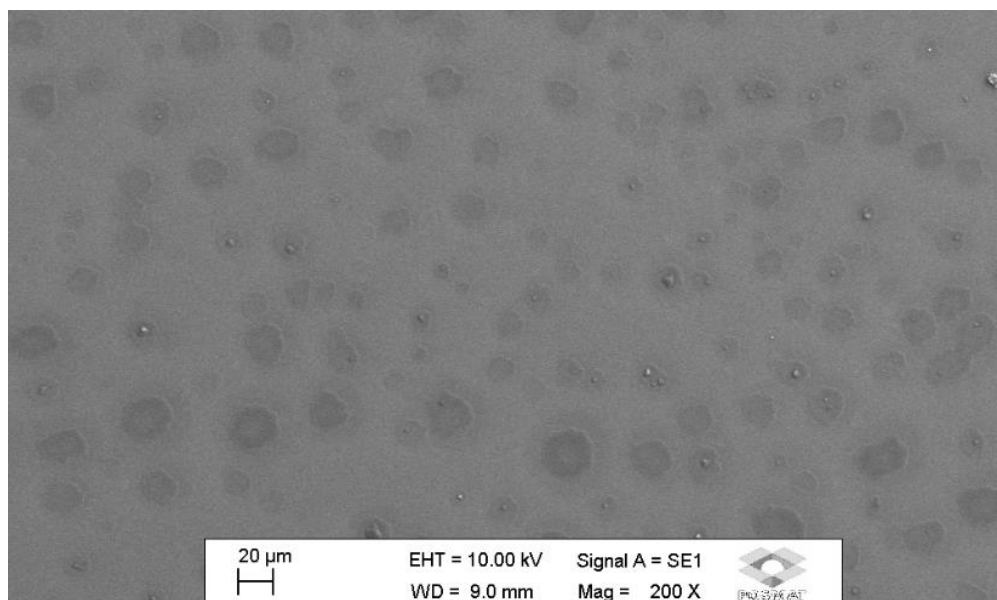
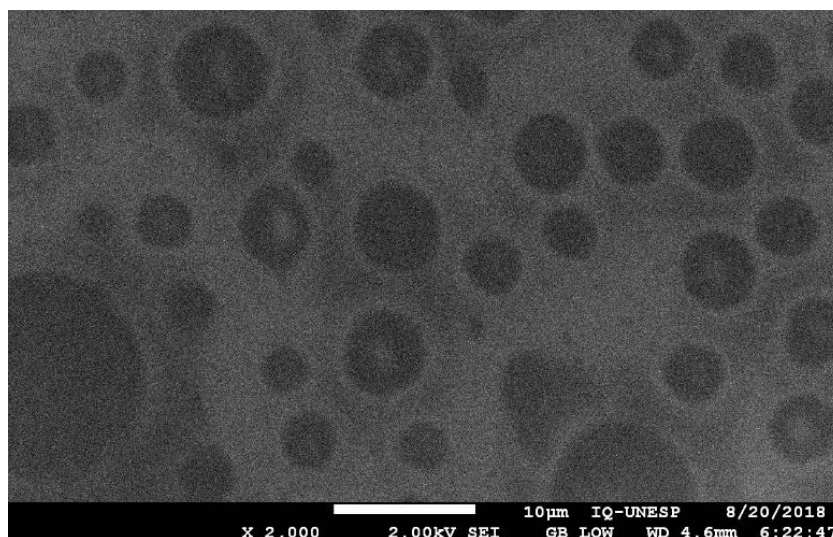


Figura 12. Imagens do MEV para a nanoemulsão de óleo essencial 1 realizadas no microscópio eletrônico da Unesp de Bauru. A)Aumento de 1000x; B)Aumento de 100x; C)Aumento de 200x.

Essa segunda análise da varredura, foi realizada na Unesp de Araraquara no Instituto de Química (IQ), apenas para as nanoemulsões OE 1.

A)



B)

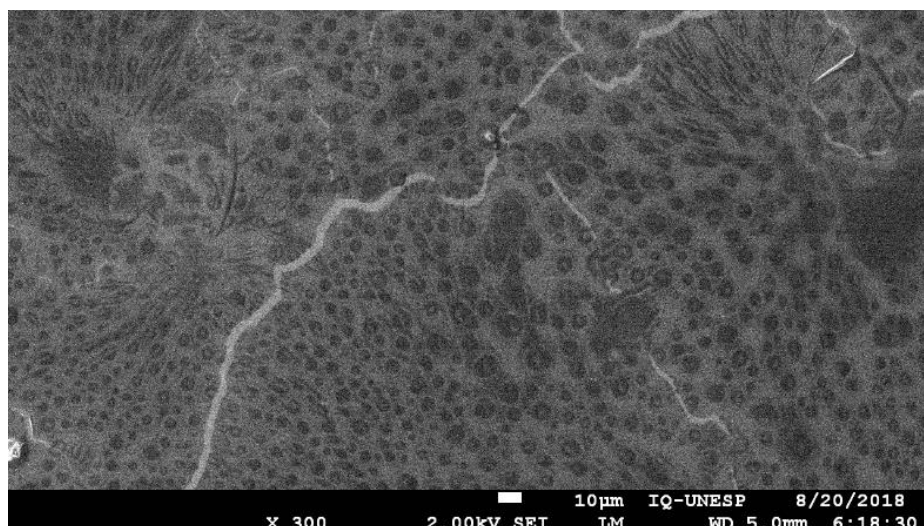


Figura 13. MEV-FEG da nanoemulsão de óleo essencial da palmarosa, formulação número 1 ou OE1, realizada no campus de Araraquara. A)Aumento de 2000x; B)Aumento de 300x.

Ao se observar a morfologia das nanoemulsões de OE de palmarosa e geraniol, preparadas através de métodos de alta pressão, com variações de EHL entre 6,78 e 11,74, pode-se notar que as gotículas são claramente visualizadas. Além disso, a forma da gota de geraniol é esférica, e a porção cinzenta das gotículas resulta do óleo essencial ou geraniol incorporado no sistema de emulsão.

Não foi possível definir o tamanho médio das gotículas devido ao artefato de formar aglomerados durante o preparo das amostras para análise de MEV, que compreende em uma etapa de secagem à temperatura ambiente. Assim, conforme ocorre a evaporação da água, as gotículas tendem a formar aglomerados (FERNANDEZ et al., 2004).

A leitura desses compostos utilizando MEV é muito comum, porém podem surgir problemas como os observados anteriormente. Outros autores apresentaram as mesmas dificuldades durante a leitura de nanopartículas. Porto (2015) preparou nanopartículas utilizando Tween 20 e Span 80 com acetato de zinco e sulfato de zinco, porém durante as leituras não foi possível definir o tamanho médio das estruturas já que se apresentam aglomeradas devido ao modo de preparo para análise pois, as amostras são secas à temperatura ambiente, e conforme a evaporação da água, elas tendem a formar aglomerados ou a diluição ser insuficiente para observar as nanopartículas afastadas.

5.2.10 Microscopia óptica

A avaliação por microscópica óptica e, portanto de baixa resolução, não revelou diferenças entre as nanoemulsões, tanto as com OE como as de geraniol. Ela mostrou a presença de glóbulos muito pequenos em meio a alguns glóbulos maiores, todos sempre em movimento graças aos movimentos brownianos. A figura 14 mostra a OE2.

Como a emulsificação é um processo de agitação aleatória, a nanoemulsão resultante é dada por um sistema polidisperso onde gotas pequenas e grandes coexistem (SALAGER, 2000).

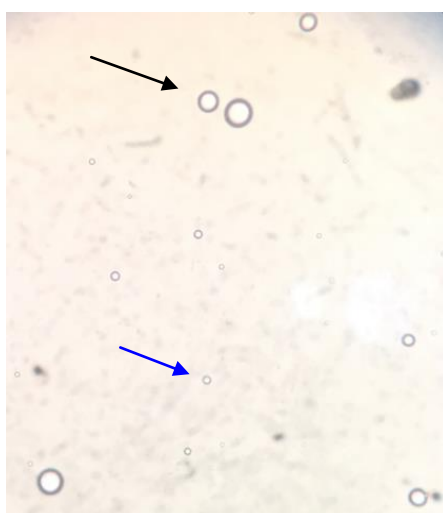


Figura 14. Fotomicrografia da nanoemulsão OE2. Aumento de 400x. Nota-se a diferença entre o tamanho dos glóbulos dispersos.

5.2.11 Tamanho, potencial Zeta e índice de polidispersividade

O espalhamento dinâmico de luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*) usado para determinar o potencial zeta (PZ), o tamanho e a polidispersividade, trata-se de uma técnica não invasiva para a medição do tamanho das partículas de fase interna de um sistema micro ou nanoemulsionado. As gotículas são iluminadas por um feixe de luz laser, ocorrendo o espalhamento desse, que, sendo detectado em um ângulo determinado, varia em uma taxa dependente do movimento browniano da partícula, ou seja, da sua velocidade de difusão, a qual, por sua vez, é governada pelo seu tamanho, fornecendo informações diretas sobre o movimento translacional das gotículas e permitindo o cálculo do tamanho dessas, através de relações empíricas adequadas. Caso o sistema esteja em elevadas concentrações, a

interpolação torna-se dificultada em razão das interações intergotículas, sendo necessário, nesses casos, fazer uma diluição para facilitar a sua identificação (FORMARIZ et al., 2006).

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. Este parâmetro é determinado utilizando-se técnicas de eletroforese (SCHAFFAZICH et al., 2003).

A leitura do potencial zeta foi realizada no equipamento Zetasizer modelo Nano ZS e os dados apresentados são a relação do diâmetro médio, índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta das amostras (G1 – G5 e OE1 – OE5) formuladas a temperatura de 25 °C. As medidas foram realizadas após um período de 20 dias da síntese.

Como a emulsificação é um processo de agitação aleatória, a nanoemulsão resultante é dada por um sistema polidisperso onde gotas pequenas e grandes coexistem, representando o índice de polidispersividade analisado pelo equipamento (SALAGER, 2000). O índice de polidispersividade (IPD) é uma medida da homogeneidade da dispersão em relação ao diâmetro e varia de 0 a 1. Valores próximos de zero indicam homogeneidade da dispersão, enquanto valores que se aproximam de 1 indicam alta heterogeneidade (YUAN et al., 2006).

O tamanho médio das gotículas (ou micelas), as curvas de distribuição de tamanho e o índice de polidispersão foram usados para caracterizar as formulações. Uma das melhores formas de caracterização de nanoemulsões (ou emulsões de uma forma geral) é pelo seu tamanho de gotas. A melhor forma de se descrever uma emulsão seria por sua distribuição de tamanho de gotas (DTG), o que dá ao analista um levantamento estatístico da fragmentação da fase dispersa. Quando a DTG é medida por um aparelho analisador, a distribuição de frequência geralmente é feita em volume, ou seja, através da razão de volume de gotas inclusas num determinado volume total de amostra. Tal informação é extremamente valiosa na prática, já que tanto a estabilidade do sistema quanto sua viscosidade final depende diretamente desta distribuição (SALAGER, 2000). Os métodos usuais para a determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas consistem em espectroscopia de correlação de fótons (potencial zeta) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Valores ideais para potencial zeta ficam próximos a -30mV, para a polidispersividade (PDI) o ideal para um sistema nanoestruturado é que apresente valores até 0,3 e o tamanho

das partículas devem estar entre 50 e 200 nanômetros para formulações cosméticas. No estudo de Salvia-Trujillo et al. (2015), o potencial zeta das suas nanoemulsões exibiu valores mais negativos que -30 mV, indicando uma forte repulsão eletrostática das gotículas de óleo dispersas na fase aquosa. Em síntese, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes.

A Tabela 12 mostra os valores encontrados para potencial zeta, índice de polidispersividade, tamanho das gotículas e as relaciona com a densidade, valores de EHL e viscosidade média. O potencial zeta das nanoemulsões que exibiram valores próximos a -30 mV foram os preparados G1,G2 e OE1.

Os tamanhos observados foram de 60 nm até 165 nm e uma distribuição homogênea de tamanho de gota, sendo uma característica da metodologia selecionada para o preparo dos sistemas emulsionados sob condições de alta energia por meio de ultrassonicação. Portanto, a associação dos tensoativos hidrofílico e lipofílico escolhidos possibilitou a obtenção de nanoemulsão estável.

Salvia-Trujillo et al. (2015) mostraram em seu trabalho que, em geral, o tamanho médio das gotículas de emulsões foi drasticamente reduzido após a microfluidização de emulsões grosseiras, para poucos nanômetros. Foram preparadas nanoemulsões com óleos essenciais de erva cidreira, cravo, chá verde, tomilho, gerânio, manjerona, palmarosa, paurosa, sálvia ou hortelã e a estabilização ocorreu com Tween 80 e alginato de sódio. O potencial zeta das nanoemulsões exibiu valores mais negativos que -30 mV, indicando forte repulsão eletrostática das gotículas de óleo dispersas na fase aquosa. Eles dizem ainda que emulsões de ponteiros ultrassônicas são menos polidispersas e mais estáveis quando comparadas com outras que foram preparadas utilizando outros dispositivos mecânicos.

Chien-Lu et al. (2018) observou resultados parecidos quando preparou nanoemulsões com óleo essencial de citral. Foram encontrados picos significativo entre 10 nm e 100 nm e uma distribuição clara do tamanho de gota causada pela emulsificação ultrassônica.

Vários estudos têm sido desenvolvidos para a avaliação dos principais fatores que afetam o diâmetro das partículas de sistemas nanoestruturados. Geralmente, as nanopartículas, mesmo preparadas através de diferentes métodos, apresentam diâmetros médios entre 100 e 300nm, no entanto, partículas com diâmetros em torno de 60 a 70 nm ou mesmo inferiores a

50nm podem ser obtidas. A composição quali-quantitativa e o método de preparação dos nanocompostos são fatores determinantes do diâmetro médio e da polidispersão das partículas. No caso das nanocápsulas, um fator importante, que influencia o diâmetro das partículas, é a natureza do óleo utilizado como núcleo. Os resultados são atribuídos às diferenças de viscosidade, hidrofobicidade ou tensão interfacial das substâncias empregadas (SCHAFFAZICH et al.,2003).

Calvo e colaboradores (1996) observaram os efeitos da composição das diferentes formulações sobre os valores do potencial zeta. Foi verificado que a presença da fase oleosa, nas nanocápsulas e nanoemulsões, conferiu a estas um potencial zeta mais negativo ($\zeta = -41,94$ mV e $\zeta = -42,32$ mV, respectivamente) em relação às nanoesferas ($\zeta = -16,33$ mV).

5.2.12 Análise macroscópica e cor

Após 24 horas da manipulação todas as formulações apresentaram as mesmas características macroscópicas: emulsão fluida e ausência de cremeação ou separação de fases.

As emulsões apresentaram aspecto opaco e branco-leitoso quando os valores de EHL eram de 6,78 e 11,74 e transparentes ou translúcidas nos valores de EHL entre 8,02 e 10,5.

Há uma relação entre o tamanho das partículas e sua cor. Quanto menor o tamanho das gotículas, mais clara ou transparente é seu aspecto. Cores brancas ou leitosas indicam tamanho maior de glóbulos ou formação de macroemulsão (ZANIN et al.,2002).

Após todos os testes realizados, as formulações mais translúcidas foram as formulações de número 3, tanto para a nanoemulsão de óleo essencial quanto para as nanoemulsões com geraniol. As gotículas dessas formulações apresentaram valores de 63,3d.nm e 55,4d.nm respectivamente, ou seja, estes foram os menores tamanhos de gotícula da tabela. Estes dados podem ser observados na Tabela 12.

Todas as formulações apresentaram bons resultados nos testes preliminares de estabilidade, mas o que diferenciou a preparação 3 das demais e fez com que ela fosse escolhida para a adição da nanopartículas de prata foram os testes finais do potencial zeta, tamanho e PDI, além da sua cor, observada macroscopicamente, que para esse tipo de trabalho, é muito importante. Apesar de alguns parâmetros serem melhores para outras formulações como potencial zeta de G1 (-34,8 mV) ou a viscosidade de G5 (0,004255 Pas.s) dentro de um conjunto, a formulação 3 foi considerada a melhor para essa etapa.

Tabela 12. Potencial zeta, tamanho e polidispersividade (PDI) das amostras analisadas. Dados da densidade, EHL das preparações e viscosidade média também estão incluídos.

AMOSTRA	PARÂMETROS					
	POTENCIAS ZETA (mv)	TAMANHO (d.nm)	PDI	EHL	Densi- dade (g/cm ³)	Visco sidade (Pa.s)
G1	-34,8	97,9	0,172	6,78	1,002	0,003565
G2	-30,6	87,5	0,238	8,02	0,994	0,003816
G3	-25,6	63,3	0,253	9,26	0,999	0,003639
G4	-18,3	132,2	0,058	10,5	1,000	0,004235
G5	-18,5	164,9	0,076	11,74	0,981	0,004255
OE1	-34,5	108,1	0,166	6,78	0,995	0,003539
OE2	-23,7	76,40	0,246	8,02	1,002	0,003504
OE3	-24,4	55,4	0,203	9,26	0,999	0,003605
OE4	-16,6	110,4	0,054	10,5	0,992	0,003772
OE5	-17,0	139,4	0,043	11,74	0,996	0,003822

6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

6.1.1 Atividade antibacteriana do geraniol e do óleo essencial da Palmarosa

O óleo essencial da palmarosa, o geraniol e a clindamicina foram testados sobre três cepas ATCC de *C. acnes* e duas cepas ATCC de *Staphylococcus epidermidis*. O *S. epidermidis* foi incluído nas análises por se tratar de uma bactéria abundante da pele humana. Os resultados obtidos para CIM e CBM para ambas bactérias encontram-se nas tabelas 13 e 14.

A clindamicina foi escolhida como fármaco padrão, pois trata-se de um fármaco semi-sintético da classe das lincosamidas que tem ação bacteriostática por inibição da síntese proteica. É utilizada em infecções causadas por bactérias Gram-positivas, geralmente via oral ou topicamente e é um dos antimicrobianos utilizados no tratamento da acne (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Tabela 13. Atividade antimicrobiana do óleo essencial da palmarosa, do geraniol e da clindamicina sobre três cepas-padrão ATCC de *C. acnes*.

PRODUTO TESTADO	TESTE (µg/mL)	<i>C. acnes</i> ATCC		
		6919 ⁺	11828 ⁺	11827 ⁺
OE Palmarosa	CIM*	>5000 ^b	5000 ^b	1250 ^b
	CBM**	>5000 ^b	5000 ^b	5000 ^b
Geraniol	CIM	>5000 ^b	5000 ^b	1250 ^b
	CBM	>5000 ^b	5000 ^b	5000 ^b
Clindamicina	CIM	39,06 ^a	19,53 ^a	2,44 ^a
	CBM	156,25 ^a	39,06 ^a	39,06 ^a

*CIM: concentração inibitória mínima (µg/mL); **CBM: concentração bactericida mínima (µg/mL)

Nota: Letras diferentes na mesma linha indicam uma diferença média de concentração estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$); ⁺ Teste Kruskal-Wallis entre CIM e os compostos antimicrobianos - valor $p < 0,001$

Tabela 14. Atividade antimicrobiana do óleo essencial da palmarosa, do geraniol e da clindamicina sobre duas cepas-padrão ATCC de *S. epidermidis*.

PRODUTO TESTADO	TESTE (µg/mL)	<i>S. epidermidis</i> ATCC	
		12228 ⁺	35984 ⁺
OE Palmarosa	CIM	2500 ^b	2500 ^b
	CBM	2500 ^b	2500 ^b
Geraniol	CIM	2500 ^b	2500 ^b
	CBM	2500 ^b	2500 ^b
Clindamicina	CIM	312,5 ^a	312,5 ^a
	CBM	312,5 ^a	312,5 ^a

Nota: Letras diferentes na mesma linha indicam uma diferença média de concentração estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$); ⁺ Teste Kruskal-Wallis entre CIM e os compostos antimicrobianos - valor $p < 0,001$

A CIM define a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento do micro-organismo de maneira visível após a incubação (ALBANO *et al.*, 2016). Já a CBM representa a concentração em que 99,9% ou mais do inóculo inicial é morto (BURT, 2004).

Inúmeros estudos como os de Marino *et al.*, 2001; Cimanga *et al.*, 2002; Delaquis *et al.*, 2002; Pintore *et al.*, 2002; Harpaz *et al.*, 2003 dentre outros, que investigaram a ação de óleos essenciais contra micro-organismos confirmam que, geralmente, eles são um pouco mais ativos contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas. Pode-se esperar que

organismos Gram-negativos sejam menos suscetíveis à ação de antibacterianos, uma vez que eles possuem uma membrana externa hidrofílica devido a sua cobertura de lipopolissacarídeos fazendo parte da parede celular, o que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos, como os óleos essenciais (BURT, 2004). No entanto, nem todos os estudos sobre OEs concluíram que os Gram-positivos são mais suscetíveis (WILKINSON et al., 2003). Andrade (2013) também relacionou vários estudos mostrando maior susceptibilidade das bactérias Gram-positivas frente aos óleos essenciais do que as bactérias Gram-negativas.

O óleo essencial da palmarosa (*Cymbopogon martinii*) mostrou atividade antimicrobiana sobre as cepas de *C. acnes* e *S. epidermidis* testadas, porém nota-se valores mais elevados de CIM e CBM para a cepa ATCC 6919 de *C. acnes*, com valores de 5000 µg/mL ou acima.

A cepa ATCC 6919 mostrou-se mais resistente ao tratamento (CIM= >5000 µg/mL) e a cepa 11828 apresentou resultado intermediário entre as outras duas (CIM=5000 µg/mL). O resultado da Tabela 13 para o fármaco padrão confirma que a cepa 6919 é a mais resistente, pois apresenta maior valor tanto para CIM quanto para CBM. Andrade et al. (2018) testaram a atividade antimicrobiana de *Cymbopogon martinii* frente as cepas 6919 (tipo IA) e 11828 (tipo II) de *C. acnes* obtendo valores de CIM de 1500 µg/mL e 700 µg/mL, respectivamente. Os autores concluíram ainda que a cepa 11828 foi a mais sensível ao tratamento dentre todas as testadas. Para o atual estudo, resultados de CIM maiores foram encontrados em relação ao estudo. O melhor resultado foi obtido para a cepa ATCC 11827 (CIM=1250 µg/mL) ou tipo III. Andrade et al. (2018) obtiveram um valor de CIM de 1600 µg/mL para a *C. acnes* de tipo III, linhagem PMH5. Apesar disso, outro estudo mostrou maior potencial antimicrobiano da palmarosa frente a outros óleos essenciais como o de lavanda e prímula (LODHIA et al., 2009), mostrando seu potencial.

A atividade antimicrobiana final de um determinado óleo essencial é uma combinação de composição e concentração de cada composto volátil, que por sua vez são regidos pela variedade de planta, condições de crescimento e método de extração do óleo essencial e dessa forma podem variar de um lote para outro mesmo se tratando da mesma planta (SALVIA-TRUJILLO et al., 2015).

Óleos ricos em monoterpenóides, segundo Bakkali et al. (2008) são hidrofóbicos e provavelmente irão preferir se deslocar da fase aquosa em direção às estruturas da membrana. O acúmulo dos constituintes dos óleos essenciais na bicamada lipídica da membrana

citoplasmática irá conferir a esta uma característica de permeabilidade, promovendo a dissipação da força próton motora, redução do pool de ATP, do pH interno e do potencial elétrico, e a perda de íons como potássio e fosfato. Esses danos na membrana levam ao comprometimento das suas funções. Muitos álcoois terpênicos foram identificados na composição dos óleos essenciais de gengibre e capim-citronela, como citronelol, geraniol, terpineol e o linalol. Pesquisas de Dorman et al. (2000) inferem que álcoois agem como desidratantes e solventes provocando a desnaturação das proteínas.

Scherer et al. (2009) realizaram estudos sobre ação antimicrobiana para os óleos essenciais da palmarosa e da citronela (*Cymbopogon winterianus*) ambos do gênero *Cymbopogon*, família Poaceae. A citronela contém o beta-citronelal (45%) e o geraniol (20,71%) como compostos em maior quantidade em seu óleo essencial. A citronela apresentou melhores resultados bactericidas sobre *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Enquanto que a palmarosa apresentou maior eficácia contra *S. aureus*, um coco Gram-positivo, assim como a *C. acnes*, também uma bactéria Gram-positiva. O valor de CIM obtido para *S. aureus* ficou entre 600 µg/mL e 800 µg/mL. Valores estes bastante inferiores aos valores obtidos para CIM para as linhagens 6919 e 11828 de *C. acnes* (Tabela 13), porém mais próximos ao CIM da cepa 11827.

Ainda no estudo de Scherer et al. (2009) foi estabelecido, tendo como base o estudo feito por Aligiannis et al. (2001), uma classificação para atividade antimicrobiana de materiais vegetais, de acordo com os resultados de CIM, sendo considerada como forte, moderada e fraca atividade antimicrobiana de óleos ou extratos que apresentem CIM até 0,5 mg mL⁻¹, entre 0,6 e 1,5 mg mL⁻¹, e acima de 1,6 mg mL⁻¹, respectivamente. Considerando estes parâmetros e para este estudo o óleo da palmarosa demonstrou eficiência de moderada a fraca

Os resultados de CIM para a ação do OE frente a *S. epidermidis* foram de 2500 µg/mL para as cepas 12228 e cepa 35984 (cepas não formadoras de biofilme e sensíveis a vancomicina).

Ao observar os testes de CIM e CBM para o produto majoritário geraniol, os valores são idênticos aos observados para o OE como um todo. Não há surpresas neste resultado, já que geraniol é o composto em maior quantidade no óleo essencial, conforme análise cromatográfica mostrou, sendo o responsável pela sua atividade antimicrobiana. Os resultados da Tabela 13 confirmam essa informação.

Andrade et al. (2018) também observaram valores de CIM e CBM para geraniol. O valor de CIM para ATCC 6919 foi de 1500 µg/mL e para ATCC 11828 foi de 800 µg/mL. Para *C. acnes* tipo III, o valor de CIM foi de 1600 µg/mL, porém a bactéria tipo III é classificada como PMH5 e a utilizada no estudo atual é uma cepa tipo III ATCC de número 11827. Segundo a nova classificação para *C. acnes*, as bactérias agrupadas dentro de cada tipo possuem semelhanças genéticas em relação a sequências G+C do DNA e também a composição peptidoglicanos da membrana. No atual estudo a cepa 6919 apresentou CIM >5000 µg/mL, a 11828 CIM de 5000 µg/mL e a cepa ATCC 11827 de 1250 µg/mL, ou seja, os valores foram correspondentes apenas em relação a cepa 11827.

Segundo Albano et al. (2016) o geraniol, quando aplicado sobre diferentes cepas produtoras de enterotoxinas da bactéria Gram-positiva *S. aureus*, apresentou valores de CIM entre 800 e 1000 µg/mL e para bactérias *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) e sensíveis a meticilina (MSSA) os valores foram de 1450 e 800 µg/mL, respectivamente. Os resultados obtidos para valores de CIM do geraniol frente às linhagens da bactéria *Cutibacterium acnes*, bactéria também gram-positiva, revelaram-se bastante superiores quando comparado a *S. aureus*. Os únicos valores próximos encontrados, foram para geraniol frente a cepa gram-positiva 11827 (1250 µg/mL).

Albano et al. (2016) avaliaram ainda os mecanismos de ação antibacterianos do geraniol frente as bactérias *E. coli* e MRSA através da microscopia eletrônica de transmissão e detectaram que células tratadas com ele mostraram perda completa integridade da membrana, separação da membrana citoplasmática de sua parede celular, vazamento de conteúdo citoplasmático e polarização citoplasmática.

Como este é um trabalho de base para futuro desenvolvimento de um creme facial para tratamento da acne vulgar, os resultados mostram-se positivos já que a *C. acnes* tipo I está relacionada à acne severa e a *C. acnes* tipo II, a abscessos subcutâneos.

Um estudo realizado na China por Yue et al. (2017) em que o geraniol foi testado frente a *S. aureus* e *E. coli*, concluiu que geraniol teve ação mais significativa contra a bactéria Gram-positiva do que sobre as bactérias Gram-negativa.

Como clindamicina é uma droga conhecida por sua atividade bacteriostática (GUIMARÃES et al., 2010) os valores de CIM e CBM encontrados foram bastante inferiores em relação aos valores para o óleo essencial e para o geraniol. Pelos valores de CIM da clindamicina aumentados para a cepa 6919 (CIM= 39,06 µg/mL), pode-se concluir que é uma

cepa mais resistente do que as demais, que apresentaram valores de CIM de 19,53 µg/mL e 2,44 µg/mL para cepa 11828 e 11827, respectivamente frente a clindamicina.

Os valores de CBM para as linhagens de *C. acnes* foram todos maiores ou iguais a 5000 mg/mL, indicando ações bacteriostáticas. Kannappan et al. (2017) realizaram estudos de CIM para geraniol frente a *S. epidermidis* e sua capacidade de inibir a formação de biofilme desta bactéria. Os resultados encontrados foram de CIM = 512 µg/mL e a exposição sequencial de *S. epidermidis* a sub-valores de MIC de geraniol levaram a uma resistência adaptativa deficiente e a diminuição da formação de biofilme.

Quando o foco são as linhagens de *C. acnes*, outros estudos mostraram que é uma bactéria que pode ser inibida com o uso de produtos naturais, o que ajudará a resolver questões futuras de resistência a antimicrobianos comerciais. Sharma et al. (2013) testaram a ação do extrato etanólico de folhas de jambo contra *C. acnes* cepa ATCC 11827 e encontraram um excelente valor de CIM (31,3 µg/mL). Liu e Huang (2013) pesquisaram a capacidade antimicrobiana da cumarina frente a *C. acnes* ATCC 6919. Os resultados encontrados para CIM foram de 23,73 µg/mL, mostrando uma ótima atividade inibitória.

6.1.2 Atividade Antimicrobiana das Nanoemulsões preparadas com o óleo essencial da Palmarosa e com Geraniol

Os testes antibacterianos com as cinco nanoemulsões preparadas com óleo essencial de palmarosa (OE1, OE2, OE3, OE4 e OE5) e com as nanoemulsões de geraniol (G1, G2, G3, G4 e G5) foram realizados somente para a cepa ATCC 11828 de *C. acnes* que além de causar a acne, é responsável também pela formação de abscessos subcutâneos. Estes resultados, porém serviram apenas como uma análise preliminar para detectar a presença ou ausência de atividade após os compostos serem inseridos em nanoemulsões. Foi também uma forma de sinalizar a continuidade das formulações das nanoemulsões. A faixa de concentração de CIM para esse teste especificamente foi mais extensa do que para os demais (13.092,96 até 3,19 µg/mL).

Os resultados preliminares de CIM foram bastante significativos, conforme apresentados na tabela 15. Quase todas as nanoemulsões apresentaram valores de CIM de 818,3 µg/mL, com exceção de G5 que apresentou CIM de 409,15 µg/mL, valor ainda melhor do que os anteriores. G5 é composta por maior porção hidrofílica (água e Tween20) do que porção hidrofóbica (Span80 e geraniol). Os valores de CBM e CIM foram iguais para as

nanoemulsões de G1 á G5 (818,3 µg/mL) e para OE1 á OE5 foram de 1636,62 e 818,3 µg/mL.

Tabela 15. Testes de atividade antimicrobiana preliminar das nanoemulsões de OE da palmarosa (OE1 a OE5) e das nanoemulsões do geraniol (G1 á G5) recém-preparadas.

PRODUTO TESTADO	TESTE (µg/mL)	C. acnes ATCC 11828
Nanoemulsão com OE Palmarosa	CIM* OE1,OE2,OE3,OE4,OE5	818,3
	CBM** OE1,OE2,OE3,OE4,OE5	1636,6
Nanoemulsão com Geraniol	CIM G1,G2,G3,G4 G5	818,3 409,1
	CBM G1,G2,G3,G4,G5	818,3

Salvia-Trijullo et al. (2015) testaram a atividade antimicrobiana de emulsões e nanoemulsões de alguns óleos essenciais, incluindo a palmarosa, sobre *E. coli*. Eles observaram que emulsões e nanoemulsões contendo óleo essencial da palmarosa mostraram umas das atividades antimicrobianas mais fortes, reduzindo exponencialmente a quantidade de bactérias em 30 minutos. Eles prepararam as nanoemulsões a partir do método de microfluidização e as emulsões utilizando homogeneizadores de alta pressão. A transformação de macroemulsões em nanoemulsões afetaram significativamente a atividade antimicrobiana, já que as nanoemulsões exibiram uma maior e mais rápida inativação sobre *E. coli*, que é uma bactéria Gram-negativa, sobre a qual óleos essenciais apresentam efeitos inferiores quando comparado as bactérias Gram-positivas. A liberação do composto também é mais rápida na nanoemulsão do que em uma emulsão. Para chegar a essas conclusões o estudo utilizou a chamada função de distribuição de *Weibull* para avaliar a inativação cinética da bactéria. O componente beta da equação representa o fator de escala e alfa é o fator de forma. O fator de escala representa o tempo de contato (min) necessário para inativar o primeiro ciclo logarítmico da população microbiana, enquanto o fator de forma é relacionado à tendência da curva de inativação. Um fator de forma com valor inferior 1 implica em liberação rápida do composto nos primeiros momentos de contato e valores superiores a 1, implicam em uma lenta liberação de compostos fenólicos. O valor de beta para a emulsão preparada com

palmarosa foi de 7,37 minutos, enquanto que para a nanoemulsão foi de 4,39. O mesmo ocorreu com a fator alfa, relacionado a liberação do princípio ativo, como emulsão ele tinha um valor de 1,02 e depois passou a ter um valor de 0,71 quando na forma de nanoestrutura. O melhor valor de fator beta para este estudo foi para a erva-cidreira, que na forma de emulsão era de 22,30 minutos e como nanoemulsão mostrou valores de 6,97. Porém o fator alfa da emulsão, mostrou-se melhor para este caso: era 4,68 e depois passou a ser 0,98.

Como as formulações mostraram potencial antimicrobiano, elas então passaram por todos os testes de caracterização propostos para as nanoemulsões foram realizados, chegando a conclusão que a melhor formulação tanto para nanoemulsão de palmarosa quando de geraniol é a formulação de número 3. Um conjunto de fatores foi levado em conta para a escolha do melhor composto física e quimicamente falando, e este foi o escolhido para seguir em frente nos novos testes antimicrobianos e aos quais a prata seria adicionada.

Todos os testes antimicrobianos utilizaram concentrações de CIM de 5000 á 39,06 µg/mL como forma de facilitar comparações e estudos de estatística. A tabela 15 mostrando testes preliminares para as nanoemulsões não entra nesta comparação ou estatística.

A Tabela 16 expõe os dados de CIM e CBM para as nanoemulsões de formulação OE3 e G3 do fármaco padrão. Clindamicina tem valores muito inferiores aos compostos testados em todos os testes, afinal é um medicamento comercial já a longo tempo no mercado.

Tabela 16. Atividade antimicrobiana das nanoemulsões OE3 e G3 e da clindamicina (que não está incluída em uma nanoemulsão) sobre três cepas-padrão ATCC *C. acnes*.

PRODUTO TESTADO	TESTE (µg/mL)	<i>C. acnes</i> ATCC		
		6919*	11828*	11827*
OE3 Palmarosa	CIM	1250 ^c	625 ^c	312,5 ^e
	CBM	5000 ^b	625 ^e	2500 ^e
Geraniol G3	CIM	1250 ^c	625 ^c	312,5 ^c
	CBM	5000 ^b	2500 ^c	1250 ^c
Clindamicina	CIM	39,06 ^a	19,53 ^a	2,44 ^a
	CBM	156,25 ^a	39,06 ^a	39,06 ^a

Nota: Letras diferentes na mesma linha indicam uma diferença média de concentração estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

* Teste Kruskal-Wallis entre CIM e os compostos antimicrobianos - valor $p < 0,001$

No geral, os antimicrobianos lipofílicos nanoencapsulados são capaz de penetrar mais facilmente através de membranas microbianas, o que leva a uma ação bactericida melhorada.

No caso de bactérias Gram-negativas como *E. coli*, a presença de proteínas (porinas) que formam canais (poros) na membrana externa da parede bacteriana permitem o influxo de partículas hidrofílicas, sendo uma barreira para compostos lipofílicos e também restringem a entrada de compostos por tamanho. Portanto, é razoável assumir que a solubilização de antimicrobianos lipofílicos dentro de nanoemulsões leva a um aumento de sítios de ligação capazes de interagir com as porina.

De acordo com trabalhos de pesquisa recentes, há um aumento na atividade antimicrobiana de nanoemulsões contendo óleos aromáticos como o óleo de tomilho (Chang, McLandsborough, & McClements, 2012), óleo de hortelã-pimenta (Liang et al., 2012), limoneno (Donsi et al., 2011) ou eugenol e cinamaldeído (Gomes, Moreira & Castell-Perez, 2011). Porém, de acordo com Buranasuksombat, Kwon, Turner e Bhandari (2011) o tamanho da gota de emulsão não tem influência sobre as propriedades antimicrobianas do óleo de murta de limão. Estes resultados aparentemente controversos indicam que uma redução significativa do tamanho das gotículas não implica necessariamente num aumento da funcionalidade do óleo essencial das nanoemulsões, já que sua atividade antimicrobiana pode ser dada pela capacidade de entrega total do sistema de sua capacidade particular em reagir com membranas microbianas. Nesse sentido, também é sabido que a permeabilidade da membrana e absorção celular é “surfactante dependente” já que a carga de gotículas é conhecida por influenciar a eficácia de antimicrobianos nanoemulsionados.

Ziani et al. (2011) relataram um efeito antagônico de surfactantes catiônicos e aniônicos sobre a atividade antimicrobiana de nanoemulsões de óleo de tomilho, atribuído à partição de moléculas de surfactante entre o óleo gotículas e superfícies microbianas. No atual estudo foram utilizados surfactantes neutros, ou seja, sem carga para evitar problemas como o anteriormente relatado.

Donsi et al. (2011) testaram a nanoencapsulação de óleos essenciais como forma de aumentar a atividade antimicrobiana em alimentos e a conclusão que eles chegaram é que menores concentrações antimicrobianas são necessárias para uma ação bactericida de compostos nanoencapsulados, com alteração mínima das propriedades organolépticas.

Não houve sucesso na utilização de nanoemulsões contra *S. epidermidis*. Não há trabalhos mostrando o uso de nanoemulsões de palmarosa ou geraniol contra *S. epidermidis*. Alguns valores chegaram a serem maiores do que 5.000 µg/mL, como a CBM OE3 para cepa 12228 e CBM de G3 para cepa 35984 (Tabela 17). Isto pode ter ocorrido devido ao pouco

tempo de contato entre as nanoemulsões e a bactéria *S. epidermidis*. As placas contendo a bactéria e os produtos garantiram que estes permanecessem juntos por apenas 24 horas, tempo este ideal para o crescimento de *S. epidermidis*, enquanto que para *C. acnes* os produtos e os micro-organismos permaneceram juntos nos mesmos poços por 48 horas. Os valores estão distantes da clindamicina, o fármaco controle, porém observando esses compostos frente às cepas de *C. acnes*, nota-se que eles possuem um potencial futuro para tratamento específico de acne.

Tabela 17. Atividade antimicrobiana da nanoemulsão OE3 da palmarosa, de G3 de geraniol e da clindamicina (que não está incluída em uma nanoemulsão) sobre *S. epidermidis*.

PRODUTO TESTADO	TESTE (µg/mL)	<i>S. epidermidis</i> ATCC	
		12228 ⁺	35984 ⁺
OE3 Palmarosa	CIM	5000 ^c	5000 ^c
	CBM	>5000 ^c	5000 ^c
Geraniol G3	CIM	5000 ^c	5000 ^c
	CBM	5000 ^c	>5000 ^c
Clindamicina	CIM	312,5 ^a	312,5 ^a
	CBM	312,5 ^a	312,5 ^a

Nota: Letras diferentes na mesma linha indicam uma diferença média de concentração estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$); ⁺ Teste Kruskal-Wallis entre CIM e os compostos antimicrobianos - valor $p < 0,001$

Os testes com *S. epidermidis* foram úteis para mostrar a reprodutibilidade do experimento e a conhecida estabilidade das nanoemulsões. O teste foi realizado com nanoemulsões preparadas em dois momentos diferentes: há 4 meses e a cerca de 10 meses de seu preparo. Os testes microbianos com *S. epidermidis* são fáceis de executar pelo fato da bactéria ser aeróbia facultativa e não exigir condições especiais de anaerobiose para seu cultivo. Os resultados foram exatamente iguais aos da Tabela 17.

6.1.3 Atividade antimicrobiana das nanoemulsões com Nanopartícula de Prata (AgNP):

As AgNP tem características químicas, físicas e biológicas únicas principalmente devido à sua alta taxa de superfície de contato. As partículas de prata preparadas por métodos biológicos mostram alta solubilidade, estabilidade e rendimento. Essa metodologia é simples, rápida, não tóxica, confiável e verde e produz partículas com tamanho e morfologia bem

definidos. Uma vez preparadas e com propriedades físico-químicas estabelecidas, as AgNPs podem ter um impacto significativo sobre propriedades biológicas, como aumentam a biodisponibilidade de agentes terapêuticos após administração sistêmica e local, afetam a captação celular, a distribuição biológica, a penetração em barreiras biológicas e os efeitos terapêuticos resultantes (ZHANG et al.,2016).

A síntese verde surgiu como uma opção viável para contornar o uso de métodos químicos. Ela representa uma abordagem rentável, confiável e que respeita o meio ambiente. O método usa vários sistemas biológicos incluindo bactérias, fungos, extratos de plantas e pequenas biomoléculas como vitaminas e aminoácidos para sua realização (ZHANG et al.,2016).

Os métodos biológicos parecem fornecer tamanho e forma de partícula controlados, o que é um fator importante para várias aplicações biomédicas. Usando proteínas bacterianas ou extratos vegetais como agentes redutores, pode-se controlar a forma, tamanho e monodispersividade das nanopartículas. As outras vantagens dos métodos biológicos são a disponibilidade de uma vasta gama de recursos biológicos, uma redução do tempo necessário, alta densidade, estabilidade e a pronta solubilidade de nanopartículas preparadas em água. Para síntese de nanopartículas via método biológico são necessários apenas três fatores: (a) o solvente; (b) o agente redutor; e c) o material não tóxico (ZHANG et al.,2016).

Uma vez preparadas, sabe-se que as nanopartículas de prata são conhecidas pelas suas atividades antimicrobiana e antifúngica (WEBBER e JIMENEZ, 2017). A prata isoladamente mostra toxicidade para uma ampla gama de micro-organismos. Acoplada a nanoemulsões mostram ser um agente antimicrobiano promissor e seguro para terapias contra infecções bacterianas (NAJAFI-TAHER et al.,2017).

A atividade antimicrobiana de AgNPs está relacionada à geração de radicais livres. Adicionalmente, AgNPs ligam-se ao DNA e bloqueiam transcrição ou se anexam a componentes da superfície celular e interromper respiração bacteriana/síntese de ATP. A prata catiônica também se liga negativamente a cargas de proteínas e ácidos nucleicos causando alterações estruturais e deformações nas paredes celulares bacterianas, membranas e ácidos nucleicos. Além disso, íons de prata são geralmente conhecidos para interagirem com um grande número de grupos funcionais de doadores de elétrons, tais como tióis, fosfatos, hidroxilas, imidazóis, indóis e aminas (NAJAFI-TAHER et al.,2017).

Os resultados obtidos nos ensaios microbiológicos de sensibilidade para este tipo de preparado são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Atividade antimicrobiana da nanoemulsão de óleo essencial OE3 +AgNP, da nanoemulsão de geraniol G3 + AgNP e da clindamicina (que não está incluída em uma nanoemulsão) sobre três cepas-padrão ATCC de *C. acnes*.

PRODUTO TESTADO	TESTE (µg/mL)	<i>C. acnes</i> ATCC		
		6919 ⁺	11828 ⁺	11827 ⁺
NanoOE3 Palmarosa +AgNP	CIM*	>5000 ^b	312,5 ^d	39,06 ^d
	CBM**	>5000 ^b	312,5 ^d	1250 ^c
NanoGeraniol G3 +AgNP	CIM	>5000 ^b	312,5 ^d	39,06 ^d
	CBM	>5000 ^b	312,5 ^d	625 ^d
Clindamicina	CIM	156,26 ^d	4,88 ^e	9,76 ^f
	CBM	156,26 ^a	4,88 ^f	19,53 ^f

Nota: Letras diferentes na mesma linha indicam uma diferença média de concentração estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$); ⁺ Teste Kruskal-Wallis entre CIM e os compostos antimicrobianos - valor $p < 0,001$

Para as cepas 11828 e 11827 as nanoemulsões contendo a nanopartícula de prata mostraram que a presença de prata nas formulações foi importante, especialmente para a cepa 11827 que quando testada com nanoemulsões na forma de OE3 e G3 possuíam CIM de 312,5 µg/mL e CBM de 2500 µg/mL para OE3 e 1250 µg/mL para G3. Com a AgNP, esses valores diminuíram para 39,06 µg/mL (CIM da nanoemulsão OE3 e G3) e CBM para 1250 µg/mL para OE3 e 625 µg/mL para G3. A cepa 6919 de *C. acnes* não teve resultados satisfatórios com a prata. Os valores são os mesmos observados para o óleo essencial analisado isoladamente, sem vantagens adicionais pela diminuição do tamanho dos glóbulos.

Outros estudos já relacionaram o uso de óleos essenciais em nanoemulsões junto de AgNP. Najafi-taher e colaboradores (2017) testaram a capacidade antimicrobiana do óleo essencial da *Melaleuca alternifolia* na forma de nanoemulsão junto de uma AgNP sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. A metodologia utilizada foi a mesma utilizada para o atual estudo, ou seja, durante a preparação das nanoemulsões a nanopartículas de prata foi adicionada a fase aquosa. Os surfactantes utilizados foram o Tween 80 e o Span 80, sistema bem parecido com o atualmente utilizado, que contém Tween 20 e Span 80. A *Melaleuca alternifolia* é um agente antimicrobianos usado para o tratamento de bactérias, pneumonia fúngica e acne. Os resultados obtidos para os ensaios antibacterianos mostraram capacidade promissora dos nanosistemas para a erradicação de bactérias Gram-

positivas e Gram-negativas (95%). Além disso, foi mostrado que a introdução de AgNPs as nanoemulsões de óleo essencial exerceu um efeito sinérgico contra *Escherichia coli* resistente a clindamicina, e um efeito aditivo na capacidade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistente a clindamicina.

Sheikholeslami et al. (2016) avaliaram os efeitos antibacterianos de nanopartículas de prata em combinação com um óleo essencial contra *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Através do cálculo das concentrações inibitórias fracionárias (FICs) utilizando valores de CIM das combinação de Ag-NPs e óleo / extrato divididos pela MIC de Ag-NPs ou óleo / extrato isolado, concluiu-se que as nanopartículas de prata apresentaram efeito adicional a atividade antibacteriana quanto em conjunto com o óleo essencial contra *S. epidermidis* e *S. aureus*.

A Tabela 19 reúne todos os valores de CIM e CBM para as nanoemulsões OE3 de palmarosa e geraniol frente às cepas ATCC 6919, 11828 e 11827 de *C. acnes*. Através desta tabela pode-se perceber que os valores numéricos dos testes realizados decaíram conforme os compostos foram incluídos em nanoemulsões ou foram unidos a nanopartículas de prata.

Tabela 19. Comparativo entre valores de CIM e CBM dos compostos.

Bactéria (Cepa ATCC)	COMPOSTOS (µg /mL)					
	OE Palmarosa	Nano OE3 Palmarosa	Nano OE3 Palmarosa +AgNP	Geraniol	Nano G3 de Geraniol	Nano G3 Geraniol + AgNP
6919						
<i>CIM</i>	>5000	1250	>5000	>5000	1250	>5000
<i>CBM</i>	>5000	5000	>5000	>5000	5000	>5000
11828						
<i>CIM</i>	5000	625	312,5	5000	625	312,5
<i>CBM</i>	5000	625	312,5	5000	2500	312,5
11827						
<i>CIM</i>	1250	312,5	39,06	1250	312,5	39,06
<i>CBM</i>	5000	2500	1250	5000	1250	39,06

6.1.4 Disco Difusão:

O teste de disco difusão é o teste de susceptibilidade microbiano mais fácil de ser executado e é frequentemente usado na determinação da atividade antimicrobiana (PEDNEKAR et al.,2012). Um disco de papel embebido com OE é colocado em cima de uma placa com ágar inoculada com bactérias. Esse teste geralmente é usado como uma verificação preliminar para atividade antibacteriana antes de estudos mais detalhados. Fatores como o volume de OE colocado nos discos, a espessura da camada de ágar e o uso ou não de solventes varia consideravelmente entre os estudos, ou seja, significa que este método é útil para a seleção entre OEs, mas a comparação de dados para publicações não é viável (BURT,2004).

A desvantagem deste método é que ele não é ideal para compostos insolúveis em água, como óleos essenciais. O conjunto de componentes do óleo essencial se dispersa através do ágar de acordo com sua afinidade pela água. A hidrofobicidade do óleo essencial cria dificuldades em obter uma dispersão estável do óleo em meio aquoso e também cria problema na difusão do componente lipofílico através do ágar. Isso leva à difusão inadequada de óleo através do meio de ágar (PEDNEKAR et al.,2012). Para contornar problemas como este foram adicionados 0,5% de Tween 20 aos meios de cultura durante sua preparação.

A Tabela 20 traz os resultados obtidos para análise de disco difusão. Ela mostra que tanto o óleo essencial da palmarosa como seu composto majoritário (geraniol) não sofreram dificuldade de se dispersar pelo ágar e inibir cepas de *C. acnes*. Apesar de comparações entre espécies do mesmo gêneros serem complexas, um estudo de disco difusão com o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*, que possui 19,6% de geraniol em sua composição, destacou-se por sua atividade antibacteriana frente a *S. aureus*, gerando halos com 33,7mm e *Listeria monocytogenes* (28,0 mm), bactérias Gram-positivas (SECCHI et al., 2011).

Os nanocompostos não foram capazes de inibir as cepas 6919 e 11827 inibindo apenas a cepa ATCC 11828 (causadora de abscessos subcutâneos). Apesar dos meios de cultura terem sido preparados com o Tween 20 e as nanoemulsões possuírem baixa viscosidade, as formulações não conseguiram dispersar pelo ágar. Outros testes já mostraram que essas substâncias possuem atividade antibacteriana, então esta não foi a causa da ausência de halo.

Ao longo de todo o trabalho a cepa 6919 apresentou-se fortemente resistente aos tratamentos em todas as metodologias. As cepas 11828 e 11827 foram mais susceptíveis

mostrando valores de halo quase próximos ao valor da clindamicina (50 mm) para a cepa 11827 (40mm) tanto para o OE quanto para o geraniol.

Tabela 20. Resultados do método de disco difusão de Kirby-Bauer.

Compostos Testados	Cepas ATCC <i>C. acnes</i> (medidas em mm)		
	6919	11828	11827
OE da Palmarosa	15	24	40
Geraniol	16	30	40
Nano OE3 Palmarosa	R*	28	R
Nano Geraniol 3	R	30	R
NanoOE3Palma+AgNP	R	24	R
NanoGeraniol3+AgNP	R	30	R
Clindamicina	50	50	50

*R= Resistente.

Najafi-taher et al.(2017) realizaram ensaios de disco difusão para determinar a atividade antimicrobiana de nanoemulsões contendo óleo essencial e nanoemulsões contendo OE e AgNPs frente as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. As nanoemulsões foram preparadas com Tween 80 e Span 80. Os diâmetros das zonas de inibição em torno dos discos foram medidos após incubação e mostraram que as atividades antibacterianas das nanoemulsões e das nanoemulsões com prata ficaram entre 25 e 30 mm, mostrando-se até mesmo maiores do que a do fármaco padrão utilizado (tetraciclina). Com isso conclui-se que as nanoemulsões são capazes de se difundir sobre meios de cultura na forma de ágar.

6.1.5 Curva de Sobrevivência (*Time Kill Curve*):

A capacidade de um agente antimicrobiano de matar uma bactéria pode ser expressa como o índice de mortes em relação a uma concentração fixa de fármaco em condições controladas. Este índice é determinado pela medida do número de bactérias viáveis em vários intervalos de tempo. O gráfico resultante é chamado de curva de sobrevivência. Ela pode ser utilizada para verificar a presença de efeitos persistentes, paradoxais e de tolerância. São usadas também para determinar o sinergismo entre dois ou mais agentes antimicrobianos. A taxa de diminuição de sobreviventes em diferentes concentrações de agentes antimicrobianos garante mais informações do que concentrações em que 99,9% do inóculo final morre (SCHWALBE et al.,2007).

Curvas do tipo *time-kill* monitoram o crescimento e morte bacterianos em uma ampla gama de concentrações antimicrobianas. Elas são utilizadas com frequência para avaliar o efeito de antimicrobianos a longo prazo. Estes dados podem ser analisados usando modelos matemáticos e são o primeiro passo para estudos de farmacocinética e farmacodinâmica (FOERSTER et al., 2016).

A interação entre um produto natural e uma droga comercial pode ser utilizada como um método rápido e eficaz contra infecções graves, podendo ter um efeito bactericida mais rápido e talvez até prevenir a resistência bacteriana (DOSLER et al., 2015).

O sinergismo e antagonismo são definidos como uma diminuição ou aumento de 2-log_{10} , respectivamente, na contagem de colônias em 48 horas. O efeito bactericida foi definido quando houve uma diminuição de $\geq 3\text{-log}_{10}$ UFC/ml a partir do inóculo inicial e bacteriostático quando inferior a 3-log_{10} UFC/mL (DOSLER et al., 2015).

A Tabela 21 traz os valores numéricos, em log de UFC/mL, para cada tratamento para bactéria *C. acnes* cepa ATCC 6919 e figura 16 é uma representação da tabela em forma de gráfico de linhas.

Tabela 21. Curva de Sobrevivência para a bactéria ATCC 6919, nos tempos 0, 6, 12, 24 e 42 horas. Resultados em log de UFC/mL.

Compostos (resultados em log de UFC/mL)	TEMPO (h)					Efeito
	0	6	12	24	48	
Bactéria 6919	5	4,8	5,3	6	9	---
(Controle)						
<i>MIC OE</i>	5	0	0	0	0	Bactericida
<i>MIC G</i>	5	0	0	0	0	Bactericida
<i>MIC OE3</i>	5	4,6	5,0	5,3	8,1	Bacteriostático
<i>MIC G3</i>	5	4,6	4,8	5,9	8,3	Bacteriostático
<i>MIC CLINDA</i>	5	5,0	4,8	4,6	4,6	Bacteriostático
25% <i>MIC OE</i> + 25% <i>MIC CLINDA</i>	5	4,7	5,0	6,2	5,0	Sinergismo Bacteriostático
25% <i>MIC G</i> + 25% <i>MIC CLINDA</i>	4	5,0	4,8	5,3	6,3	Sinergismo Bacteriostático
25% <i>MIC OE3</i> +25% <i>MIC CLINDA</i>	4,9	4,7	5,0	6,1	6,3	Sinergismo Bacteriostático
25% <i>MIC G3</i> + 25% <i>MIC CLINDA.</i>	4,0	4,7	4,8	5,4	5,4	Sinergismo Bacteriostático

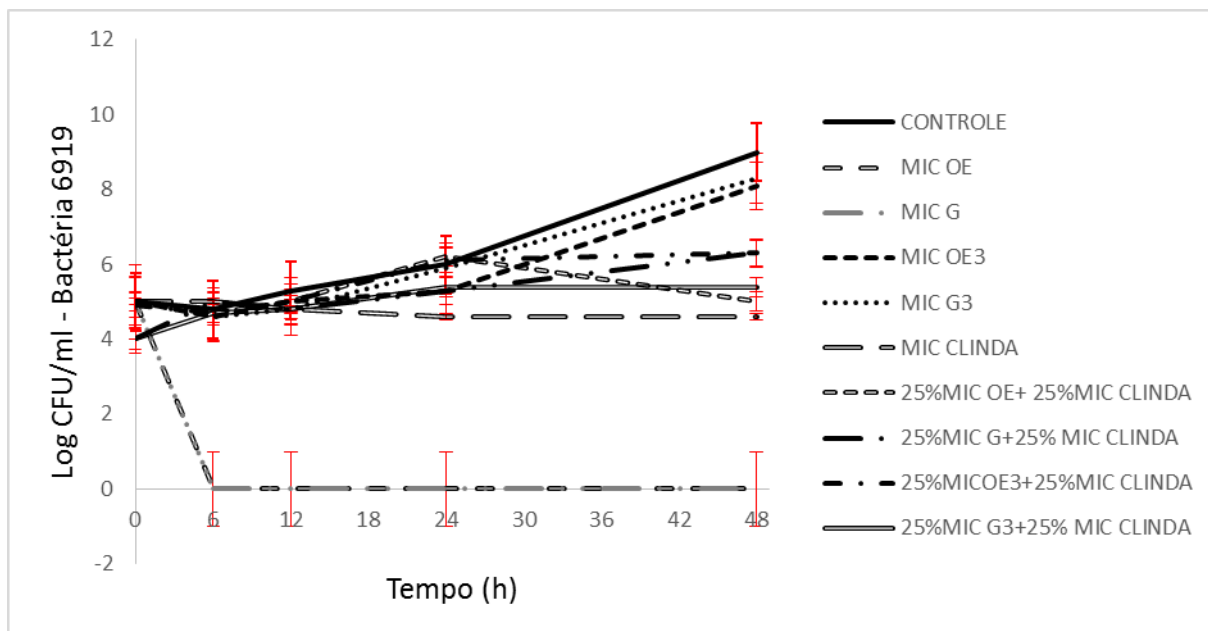


Figura 15. Curvas de sobrevivência para verificação das interações entre as diferentes combinações de antimicrobianos e o fármaco padrão (clindamicina).

Na Tabela 21 nota-se um efeito bactericida para o óleo essencial da palmarosa e geraniol após apenas 6 horas de exposição causando mais de $2,5\text{-log}_{10}$ de redução. Para as nanoemulsões de óleo essencial e de geraniol há claramente um efeito bacteriostático até 24 horas de incubação, pois há uma diminuição inferior a 3-log_{10} UFC/mL a partir do inóculo inicial. Para as combinações com 25% do MIC do óleo essencial + 25% do MIC da clindamicina; com 25% do MIC do geraniol +25% do MIC da clindamicina; com 25% do MIC da nanoemulsão de óleo essencial +25% do MIC da clindamicina e com 25% do MIC da nanoemulsão do geraniol +25% do MIC da clindamicina nota-se um efeito sinérgico bacteriostático até as 24 horas de incubação.

Para as nanoemulsões houve um expressivo aumento da contagem de colônias em até 48 horas. A seleção de mutantes resistentes, a degradação antimicrobiana e células bacterianas não afetadas, podem levar a um aumento da contagem de colônias após uma inicial redução do número de micro-organismos. Um aspecto importante desse efeito rebote é isolar os sobreviventes, determinar o CIM e analisar se esses clones resistentes foram selecionados como resultado de uma pressão seletiva. Se ocorrer uma degradação do antimicrobiano ou do extrato natural, os valores de MIC para uma cepa ATCC conhecida vão aumentar. Se uma subpopulação resistente foi selecionada, os valores de CIM dos sobreviventes serão muito maiores do que as linhagens iniciais (SCHWALBE et al.,2007). Para o atual experimento a degradação do óleo essencial e do geraniol, especialmente nas nanoemulsões, onde se

encontram em menor volume, é uma realidade. Como o experimento foi realizado em anaerobiose e a jarra que continha a placa precisou ser aberta várias vezes, deve-se considerar a volatilização do óleo essencial e do geraniol e a saturação do meio a cada troca de gerador de anaerobiose, o que provavelmente levou a perda de princípios ativos. O uso de uma câmara de anaerobiose eliminaria essa hipótese.

Albano et al. (2016) testaram a capacidade de sinergismo de geraniol junto de outras drogas comerciais (oxacilina, gentamicina, eritromicina, sulfazotrim, vancomicina, penicilina G, levofloxacino, tetraciclina e linezolida) frente as bactérias gram-positivas *S. aureus* metilicina resistente e *S. aureus* sensível a metilicina. Porém, ele não apresentou sinergismo para nenhuma das drogas, e assim não foi classificado para os ensaios de curva de sobrevivência, ensaio mais refinado e preciso para estudar interações entre substâncias antimicrobianas. Isto mostrou que geraniol, e possivelmente o óleo essencial do *Cymbopogon martinii* que é rico neste composto, não apresentaram resultados ótimos para esse tipo de ensaio, com dificuldade em realizar sinergismo. A figura 15 mostra resultados melhores quando geraniol e o óleo essencial da palmarosa estão sozinhos, livres de associações. Além do mais, a metodologia realizada para o teste, pode ter levado a perda desses compostos, que são voláteis. Embora a comparação interespecíes seja muito difícil de ser realizada, testes de sobrevivência com *Cymbopogon citratus* (nome popular: capim-cidreira), pertencente também à família Poaceae (onde se encontra o *Cymbopogon martinii*), apresentaram bom potencial inibidor para *S. aureus* e efeito bactericida, reduzindo 100% das células viáveis após 24 horas de incubação (SILVA et al.,2009).

Apesar dos desafios metodológicos devido ao fato de *C. acnes* ser uma bactéria anaeróbica, outros estudos semelhantes já foram realizados utilizando um óleo essencial contra bactérias que compõem a pele humana, incluindo *C. acnes*, *S. aureus* e *S. epidermidis* e *S. pyogenes*. Bons resultados foram obtidos, ou seja, 99% de *C. acnes* foram mortas após 30 minutos, com 1,6% do valor de CBM (PRAJAKTA et al.,2012).

A clindamicina é uma droga conhecida por ser bacteriostática. Isso ficou confirmado pelos resultados da curva de sobrevivência, que se mantiveram praticamente constantes, com uma leve queda inicial, mesmo após 48 horas de experimento.

7 CONCLUSÃO:

As nanoemulsões preparadas mostraram resultados promissores para testes preliminares de estabilidade e para as caracterizações físico-químicas realizadas, indicando que a escolha dos surfactantes foi correta. As formulações foram estáveis ao pH, condutividade elétrica, densidade, centrifugação e análise de stress térmico. A formulação de número 3 mostrou-se melhor dentre as dez preparadas pois permaneceu translúcida e apresentou valores de -25,6 mv para potencial zeta, menor tamanho (63,3 d.nm) e PDI de 0,253, valores ideais segundo a literatura consultada.

A atividade antimicrobiana foi melhorada, de uma forma geral, quando os compostos isolados (óleo essencial da palmarosa e geraniol) passaram a integrar uma nanoemulsão, mas principalmente quando a nanopartículas de prata foi acrescentada. Os valores de CIM e CBM diminuíram para as cepas 11827 (de 1250 para 39,06 µg/mL) e para a cepa 11828 (de 5000 para 312,5 µg/mL) quando os compostos foram incluídos em nanoemulsões e quando o AgNP foi adicionado à formulação. A cepa ATCC 6919 mostrou valores maiores 5000 µg/mL para as análises antimicrobianas dos compostos isolados e para as nanoemulsões com nanopartícula de prata. Houve alguma diminuição dos valores numéricos de CIM e CBM para essa cepa quando testada frente às nanoemulsões OE3 e G3 (CIM=1250 e CBM=5000 µg/mL, mesmo valor para ambas).

Assim, o estudo em questão mostrou a possibilidade de encapsulamento na forma de nanoemulsões de compostos naturais líquidos e a bactéria testada (*C. acnes*) foi susceptível a eles, podendo ser um candidato promissor a se tornar um dermocosméticos no futuro.

A nanotecnologia aplicada aos mercados farmacêuticos e médicos está em constante crescimento e despertando cada vez mais interesse, deixando assim abertas oportunidades de novas pesquisas na área.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABDEL-FATTAH N.S.; DARWISH Y.W. In vitro antibiotic susceptibility patterns of *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients: an Egyptian university hospital-based study. *Journal of the European Academy Dermatology Venereology*, v.27, p. 1546-1551, 2013.

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation. Ed. 4.1, 804 p., 2017.

ANTONIO, N. S.; OLIVEIRA, A. C.; CANESINI, R.; ROCHA, J. R. Mecanismos de Resistência Bacteriana. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. n.12, janeiro de 2009.

ANVISA. RDC 2011, de 04 de julho de 2005. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em janeiro de 2018.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. Séries Temáticas: Cosméticos, v. 1, p. 1-52, 2004

ALLAHVERDIYEV, A.M.; KON, K.V.; ABAMOR, E.S.; BAGIROVA, M., RAFAILOVICH, M., Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. *Expert Review of Anti- Infective Therapy*, n. 9, p. 1035–1052, 2011.

ALMEIDA, M. L. Estabilidade de emulsões de água-em-óleo na presença de campo elétrico externo. 2014. 103f. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, março de 2014.

ANDRADE, B. F. M. T.; BARBOSA L.N; ALVES F. C. B.; MARQUESA A. F. P.; ALBANO M.; RALL, V. L. M.; BRUGGEMANN H. and FERNANDES JUNIOR A. The impact of *Cymbopogon martinii* essential oil on *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* strains and its interaction with keratinocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, p.1-12, 2018.

ANDRADE, B. F. M. T. Produtos naturais: atividades antibacteriana e imunomoduladora *in vitro* e perfil bioquímico *in vivo*. Botucatu: Unesp, 2015.

ANDRADE, M. A. Óleos essenciais de *Cinnamomum verbenzifolium* Schawacke e *Siparuna guianensis* Aublet. Composição química, caracterização das estruturas secretoras, avaliação do potencial biológico. Lavras-MG. 2013.

ANDRADE, M. A.; CARDOSO M. G.; BATISTA L. R., MALLET A. C. T. e MACHADO S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. *Revista Ciência Agronômica*, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr-jun 2012.

- ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE HERNÁNDEZ C.; SOUZA-SOARES L. A. Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology*. v. 15, n. 2, p. 99-109, abr./jun. 2012.
- ASSUNÇÃO, L. S. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas ricas em beta-caroteno obtidas pela técnica de deslocamento de solvente. 2016. 108f. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016
- AULTON, M. E. Delineamento de Formas Farmacêuticas, 2a ed., Artmed Editora, 2005.
- BAJPAI, V.K., BAEK, K.H., KANGS.C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: a review. *Food Research International*, v.45, p. 722–31, 2011.
- BAKKALI, F.; AVERBECK S. ; AVERBECK D.; IDAOMAR, M.. Biological effects of essential oils: a review. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, n. 2, p. 446-75, Feb 2008.
- BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil. Vitória. Edufes, 2008. 624p.
- BARBOSA, T. M. and LEVY, S. B. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates*, v.3, 303–311, 2000.
- BARNARD, D.R., XUE, R. Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: culicidae). *Journal of Medical. Entomology*. v.41, p. 726–730, 2004.
- BARIL, M. B.; FRANCO, G. F.; VIANA, R. S.; ZANIN, S. M. W. Nanotecnologia Aplicada Aos Cosméticos. *Visão Acadêmica*, v.13, n.1, Jan. - Mar./2012.
- BAVIERA, G.; LEONI, M. C.; CAPRA, LUCETTA; C., LONGO; F., MAIELLO G.; GIAMPAOLO, R. N.; and ELENA G. Microbiota in Healthy Skin and in Atopic Eczema. *Hindawi Publishing Corporation BioMedical Research International*, v. 2014, p. 1-6 2014.
- BECHER, P. *Emulsions: Theory And Practice*. American Chemical Society: Washington, Dc, 2001.
- BHATIA, AJAY, MAISONNEUVE, J. F.; AND PERSING, D. H., CORIXA, D. *Propionibacterium acnes* and Chronic Diseases. The Infectious Etiology Of Chronic Diseases: Defining The Relationship. Enhancing The Research, and Mitigating the Effect. Workshop Summary, 2004.
- BHATT P., RANPARIYA V., SANANDIA ET AL. Anticonvulsant activity of essential oil of *Cymbopogon martinii*. 12th International Congress of Ethnopharmacology (ISE), 2012.
- BRUGGEMANN, H. et al. The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science*, v. 305, p. 671-673, 2004.
- BRUSCHI, M.L., et al. Semisolids Systems Containing Propolis For The Treatment Of Periodontal Disease: In Vitro Release Kinetics, Syringeability, Rheological, Textural, And Mucoadhesive Properties. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 96, p. 2074 – 2089, 2007.

- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, p. 223–53, 2004.
- BURDOCK, G.A. FENAROLI'S Handbook of Flavor Ingredients. CRC Press, pp. p. 733–734, 2010.
- CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *Journal of Pharmaceutical Science*, v85, n.5 p. 530-536, maio 1996.
- CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N., TOTTE J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, v79, p. 213– 220. 2002.
- CHAU, C-F.; WU, S-H.; YEN, G-C. The development of regulations for food nanotechnology. *Trends in Food Science & Technology*, v. 18, n. 5, p. 269-280, 2007.
- CHILLER K.; SELKIN B. A.; AND MURAKAWA G. J. Skin microflora and bacterial infections of the skin. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, vol. 6, n. 3, p. 170–174, 2001.
- CAPONE, K. A.; DOWD S. E.; G. N., AND NIKOLOVSKI J. Diversity of the human skin microbiome early in life. *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 131, n. 10, p. 2026–2032, 2011.
- DAUDT, R. M. ; EMANUELLI J.; KÜLKAMP-GUERREIRO I. C.; POHLMANN A. R., GUTERRES S. S. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. *Nanotecnologias em Artigos*, 2013.
- DELAQUIS, P.J., STANICH, K., GIRARD, B., MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. v74, p. 101–109. 2002.
- DEL GRANDE, M. Cromatografia Gasosa Princípios Básicos. Disponível em: <<http://www.cpatc.embrapa.br/eventos/seminariodequimica/1%B0%20Minicurso%20Produ%E7%E3o%20e%20Qualidade%20de%20Biodiesel/cromatografiagasosa.pdf>> Acesso: em 31 de agosto de 2018
- DESSINIOTI C. AND KATSAMBAS A. Propionibacterium acnes and antimicrobial resistance in acne. *Clinics in Dermatology*, v. 35; p. 163–167, 2017.
- DONSI F; ANNUNZIATA M.; SESSA M.; FERRARI G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *Food Science Technology*, v.44, n. 9, p.1908, 2011.
- DORMAN, D. H. J. *et al.* In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 15, n. 01, p.12-16, 2000.
- DOSLER, S.; KARAASLAN, E.; ALEV, G.A. Antibacterial and anti-biofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. *Journal of Chemotherapy*, p. 3-9, 2015.

DUARTE, I., DELLA NINA B. I., GORDIANO M. C., BUENSE R., LAZZARINI R. Hipomelanose macular progressiva: estudo epidemiológico e resposta terapêutica à fototerapia.. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 85, n.5, p. 621-624, 2010.

DUBEY, V.S., MALLAVARAPU, G.R., LUTHRA, R. Changes in the essential oil content and its composition during palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. *motia*) inflorescence development. Flavour Fragrance Journal, v. 15, p.309–314, 2000.
Farmacopéia Brasileira, 2012. Acesso em julho de 2018.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA: FORMULÁRIO NACIONAL. 2ª edição, Revisão 02, 2012. Disponível em
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259372/FNFB+2_Revisao_2_COFAR_setembro_2012_atual.pdf/20eb2969-57a9-46e2-8c3b-6d79dccf0741> Acesso em: janeiro de 2018.

FARHANG, B. Nanotechnology and lipids. Lipid Technology, v. 19, n. 6, p. 132-135, 2007.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. Brazilian Journal of Food Technology, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FERNANDEZ. P. ANDRÉ, V.; RIEGER, J. KUHMLE, A. Nanoemulsions formation by emulsions phase inversion. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. v.251, n.1-3, p.53-58, 2004.

FDA. Disponível em < <http://www.fda.gov> > Acesso em: janeiro de 2018.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. Princípios de físico-químicos em farmácia. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003, 732p.

FOERSTER S.; UNEMO M.; HATHAWAY L.J.; LOW N.; ALTHAUS C. L. Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for in vitro evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae*. BMC Microbiology. V.16, n.216. 2016

FORMARIZ, T.P.; URBAN, M.C.C.; 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, p. 301-313, 2005.

FREDRICKS, D. N. Microbial ecology of human skin in health and disease. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, vol. 6, n. 3, p. 167–169, 2001.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. Nature Chemical Biology, v. 3, n. 7, p. 408-14, Jul 2007.

GIMENEZ I.F., ANAZETTI M.C., MELO O.S., HAUN M., AZEVEDO M.M.M., DURÁN N., ALVES O.L. Cytotoxicity on V79 and HL60 Cell Lines by Thiolated-β-CyclodextrinAu/Violacein Nanoparticles Journal of Biomedical Nanotechnology, v.1, p. 1-7, 2005.

GONZÁLEZ A.C., BAMIO N.A. Formulaci3n de productos dermocosméticos. Limpiadores faciales. Revista del Mundo Farmacéutico. Junho 2002

GONÇALVES L. S. e MEJIA D. P. M. O uso da Nanotecnologia na Formulação de Cosméticos. 2014. 12f. Monografia (pós-graduaç3o) - Faculdade Cambury Goiânia, 2014.

GONZALEZ R.; WELSH O. ; CAMPO J.; *et al.* In vitro antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients in northern Mexico. International Journal of Dermatolog, v.49, p.1003-1007, 2010.

GOMES, R. K.; DAMAZIO, M. G. Cosmetologia: descomplicando os princípios ativos. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 3.ed, 2009.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. Food Research International. v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.

GHOLAM-REZA T.; MOHSEN M.; MAHMOUD B.; MAHMOUD R. K. Synergistic effect of *Carum copticum* and *Mentha piperita* essential oils with ciprofloxacin, vancomycin, and gentamicin on Gram-negative and Gram-positive bacteria. International Journal of Pharmaceutical Investigation, v.7, n.2, p. 82-87, 2017.

GRICE E. A., K ONGH. H.; RENAUD G. *et al.* A diversity profile of the human skin microbiota. Genome Research, vol. 18, n. 7, p. 1043–1050, 2008.

GRIFFIN, S.G.; WYLLIE, S.G.; MARKHAM, J.L.; LEACH, D.N. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. Flavour and Fragrance Journal, v. 4, p. 322-332, 1999.

GUGLIELMINI, G. Nanostructured novel carrier for topical application. Clinics in Dermatology, vol. 26, nº 341. 2008.

GUIMARÃES D. O.; MOMESSO L. S. e PUPO M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas Para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes. Química Nova, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HARPAZ, S.; GLATMAN, L.; DRABKIN, V.; GELMAN, A. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of fresh water reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). Journal of Food Protection, v.66, n.3, p.410–417, 2003.

HARTMANN, T. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. Entomologia Experimentalis Applicata, v.80, p. 177-188, 1996.

HELGASON, T.; AWAD, T. S.; KRISTBERGSSON, K.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). Journal of Colloid and Interface Science, v. 334, n. 1, p. 75-81, 2009.

HIGUCHI, W.I., MISRA, J. Physical degradation of emulsions via the molecular diffusion

route and the possible prevention thereof. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 51, p.459–466, 1962.

IMRAN M. D. and REHAN R. Synthesis, Characterization, and Applications of Copper Nanoparticles. *Analytical Letters Journal*, v. 50, n. 1, p. 50–62, 2017.

IZQUIERDO P., FENG J., ESQUENA J., TADROS T.F., DEDEREN J.C., GARCIA M.J., AZEMAR N., SOLANS C. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. *Journal of Colloid Interface Science*, v. 285, p. 388-394, 2005.

JAFARI S.M.; HE ,Y.; BHANDARI, B. Encapsulation of Nanoparticles of d-Limonene by Spray Drying: Role of Emulsifiers and Emulsifying techniques. *Drying Technology*, v.25, n.6, p.1079 – 1089, 2007.

JAHNS AC, LUNDSKOG B, GANCEVICIENE R, *et al.* An increased incidence of *Propionibacterium acnes* biofilms in acne vulgaris: a case-control study. *Brasilian Journal of Dermatoogy*. v. 167, p. 50-58, 2012.

JOHNSON , M. Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More Synatom Research. *Mater Methods*, v. 3, p. 163, 2013.

JONES, DS. *et al.* Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. *International Journal of Pharmacy*, v. 372, p. 49-58, 2009.

KANNAPPAN A.; SIVARANJANI M.; SRINIVASAN R.; RATHNA J.; PANDIAN S. K. and ARUMUGAM V. R. Inhibitory efficacy of geraniol on biofilm formation and development of adaptive resistance in *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Journal of Medical Microbiology*, vol. 66, p. 1506–1515, 2017.

KIM, J. Review of the innate immune response in acne vulgaris: activation of Toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *Dermatology*, v. 211, p. 193-198, 2005.

KENTISH, S.; WOOSTER, T. J.; ASHOKKUMAR, M.; BALACHANDRAN, S.; MAWSON, R.; SIMONS, L. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 9, n. 2, p. 170-175, 2008.

KLABUND K. J. ; STOIMENOV P. K. ; KLINGER R. L. ; MARCHIN G. L. Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents. *Langmuir*, v. 18, n.17, p. 6679–6686, 2002.

KUMAR, R., SRIVASTAVA, M., DUBEY, N.K. Evaluation of *Cymbopogon martinii* oil extract for control of postharvest insect deterioration in cereals and legumes. *Journal of Food Protection*, v.70, p. 172–178, 2007.

KUMARAN, A.M.; SOUZA, P.; AGARWAL, A.; BAKKOLLA, R.M.; BALASUBRAMANIAM, M. Geraniol, the putative anthelmintic principle of *Cymbopogon martinii*. *Phytotherapy Research*, v. 17, p. 957, 2003.

LACHMAN, L; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 3a ed., vol. II, 2001, p. 509-1517.

LANDFESTER, K.; EISENBLATTER, J.; ROTHE, R. Preparation of polymerizable miniemulsions by ultrasonication. *Journal of Coatings Technology and Research*, v. 1, n. 1, p. 65-68, 2004.

LEYDEN J.J. The evolving role of *Propionibacterium acnes* in acne. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 20, p.139–143, 2001.

LEONARDI, G. R.; MARTINS, L. G.; KUREBAYASHI, M. A. K. *Cosmetologia Aplicada*.. São Paulo: Livraria e Editora Santa Isabel Ltda, 2.ed, 2008.

LEONARDI, G. R; GASPAR, L.R.; CAMPOS, P.; MAIA, M.B.G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.77, n.5, p. 563-569, set/out-2002.

LIANG R., XU S.,SHOEMAKER C.F., LIY, ZHONG F., HUANG Q. Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* v. 60, n. 30, p. 7548, 2012.

LIMA, C. C. Avaliação da permeação cutânea do acetato de dexametasona incorporado em sistemas nanoestruturados. 2013. 48f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2013.

LIU, CHI-HSIEN AND HUANG, HSIN-YING. In Vitro Anti-*Propionibacterium* activity by Curcumin containing vesicle system. *Chemical and Pharmacy Bulletin*, V. 61, n. 4, p. 419–425, 2013.

LODHIA, M. H.; K. R. BHATT and V. S. THAKER. Antibacterial Activity of Essential Oils from Palmarosa, Evening Primrose, Lavender and Tuberose. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 71.2, p.134–136, 2009.

MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES JUNIOR A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. *Cadernos Acadêmicos*, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

RAIA M.; PARALIKARA P.; JOGEEA P.; GARKARA G.; INGLEA A. P.; DERITAB M., ZACCHINOB S. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 519, p. 67–78, 2017.

MALLAVARAPU, G.R.; RAO, B.R.R.; KAUL; P.N.; RAMESH, S.; BHATTACHARYA, A.K. Volatile constituents of the essential oils of the seeds and herb of palmarosa

(*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. *motia* Burk.). *Flavour Fragrance Journal*, v. 13, p.167–169,1998.

MASMOUDI, H.; LE DRÉAU, Y.; PICCERELLE, P.;KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *International Journal Pharmaceutical*, v.289, n.1/2, p.117-131, 2005.

MARINO, M., BERSANI, C., COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiacea and Compositae. *International Journal of Food Microbiology*, v. 67, p. 187– 195,2001.

MATSUNO, R. and ADACHI, S. Lipid encapsulation technology - techniques and applications to food. *Trends in Food Science and Technology*, v. 4, n. 8, p. 256-261, 1993.

MENDOZA N, HERNANDEZ PO, TYRING SK, *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolates from acne patients in Colombia. *International Journal of Dermatology*, v. 52, p. 688-692, 2013.

MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 47, p. 165-196, 2001.

MICHELS, L. R. Desenvolvimento, caracterização, Avaliação da Eficácia *In Vitro*, *In Vivo* e Farmacocinética de nanopartículas de superfície modificada contendo quinina. 2016. 87f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Do Pampa, Uruguaiana, 2016.

MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STROMME, M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. *Progress in Materials Science*, vol. 57, nº875, 2012.

NAJAFI-TAHER R.; GHAEMI B.; KHARAZI S.; RASOULIKOOHI S. and AMANI A. Promising antibacterial affects of silver nanoparticle-loaded tea tree oil nanoemulsion: a synergistic combination against resistance threat.*AAPS PharmSciTech*, v.19, n.3, 2017.

NICOLAOU, K. C. and MONTAGNON, T. *Molecules that changed the world*. USA: Wiley-VCH, 2008. 385 p.

NIJTEN, R. *et al.* Antibiotic resistance of enterobacteriaceae isolated from the fecal flora of fattening pigs. *Veterinary Quarterly*, v. 15, n. 4, p. 152-157, 1993.

MCDOWELL A, BARNARD E, NAGY I, *et al.* An expanded multilocus sequence typing scheme for *Propionibacterium acnes*: investigation of ‘pathogenic’, ‘commensal’ and antibiotic resistant strains. *PLOS One*, v, 7, 2012.

MIRAL R.; JIGISHA T.; PARIKHB K.; DESAIB. A. M. Microwave assisted extraction of essential oil from the leaves of Palmarosa: Multi-response optimization and predictive modelling. *Industrial Crops and Products*, v. 86, p. 311–319, 2016.

MITIĆ-ĆULAFIĆ, D., VUKOVIĆ-GAČIĆ, B. S., KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J. B., STANKOVIĆ, S., & SIMIĆ, D.M. Comparative study on the antibacterial activity of volatiles

from sage (*Salvia officinalis* L.). Archives of Biological Sciences, v. 57, n.3, p. 173–178, 2005.

MORRISON, I.D; ROSS, S. Colloidal dispersions: suspensions, emulsions and foams. USA: Wiley, 2002. 656.

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS; M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MUKHERJEE, P. K.; VENKATESH, M.; GANTAIT, A. Ayurveda in modern medicine: development and modification of bioactivity: Comprehensive natural products II. Hardbound: Elsevier, p. 479- 507, 2010

MÜLLER, R. H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 50, p. 161-177, 2000.

ODRIOZOLA-SERRANO, I.; OMS-OLIU G. and MARTÍN-BELLOSO O. Nanoemulsion-based delivery systems to improve functionality of lipophilic components. Frontiers in Nutrition, dec-2014.

OLIVEIRA, B. R. Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsão com óleos de *Carapa Guianensis* e *Copaifera sp* e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti*. 2008. 128f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 2008.

OTTO, M.. Staphylococcus epidermidis—the “accidental” pathogen. Nature Reviews Microbiology, vol. 7, pp. 555–567, 2009.

PATRICK, G. L. An Introduction to Medicinal Chemistry. New York: Oxford University Press:, 2005. 832 p.

PAILLER-MATTEI, C.; PAVAN, S.; VARGIOLU, R.; PIROT, F.; FALSON, F.; ZAHOUANI, H. Contribution of stratum corneum in determining bio-tribological properties of the human skin. Wear, v. 263, p. 1038-1043, 2007.

PAVIA, D. L., GARY M. L.; GEORGE S. K.; JAMES R. V. Introdução a Espectroscopia. Editora CENGAGE, 2010. 733p.

PEDNEKAR P. P.; VAKIL B. V.; SANE R. T.; DATAR A. G. Antimicrobial activity of essential oil of *blumea eriantha dc* against skin pathogens. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v. 4, n. 4, 2012.

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. 2011. 119f. Dissertação (mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 2011.

PORTO, A. S. Desenvolvimento de nanoemulsão O/A a base de óleo de copaíba, incorporadas com nanopartículas magnéticas de zinco. 2015. 101f. Dissertação (mestrado). Programa de Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

PERRY, A. & LAMBERT, P. *Propionibacterium acnes*: infection beyond the skin. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v.9, p.1149-1156, 2011.

PETERSEN, R. L. W.; SCHOLZ, C. F. P.; JENSEN, A.; BRÜGGEMANN, H.; LOMHOLT, H. B. *Propionibacterium Acnes* Phylogenetic Type III Is Associated With Progressive Macular Hypomelanosis. December 2016.

PINTORE, G.; USAI, M.; BRADESI, P.; JULIANO, C.; BOATTO, G.; TOMI, F.; CHESSA, M.; CERRI, R.; CASANOVA, J. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, v.17, p.15– 19. 2002

PRASHARA, A., HILIB P., VENESSA R. G., EVANSA C. S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*, v. 63 p. 569–575, 2003.

PRASAD T.N.V.K.V. and ELUMALAI E.K. Biofabrication of Ag nanoparticles using *Moringa oleifera* leaf extract and their antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 1, n. 6, p. 439-442. 2011

RAJESHKUMAR S. and BHARATH L.V. Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles A review on biomolecules involved, characterisation and antibacterial activity. *Chemico-Biological Interactions*, v.273, p. 219- 227, 2017.

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

RAO, B.R.R., KAUL, P.N., SYAMASUNDAR, K.V., RAMESH, S. Chemical profiles of primary and secondary essential oils of palmarosa (*Cymbopogon martinii*(Roxb.) Wats var. motia Burk.). *Industry and Crops Production*, v. 21, p. 121–127, 2005.

RAO, B.R.R. Biomass and essential oil yields of rainfed palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. motia Burk.) supplied with different levels of organic manure and fertilizer nitrogen in semi-arid tropical climate *Industry and Crops Production*, v.14, p. 171–178, 2001.

RAO, E.V.S.P., SINGH, M., RAO, R.S.G., RAO, B.R.R. Effect of plant spacing and application of nitrogen fertilizer on herb and essential oil yields of palmarosa (*Cymbopogon martinii* Stapf var. motia). *Journal of Agriculture Science*, v. 104, p. 67–70, 1985.

RAO, B.R.R. Aromatic plants for dry areas: sustainable alternate land use systems for dry lands. *Oriental Enterprises*, p. 157–170, 1999.

RAI M., YADAV A., GADE A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, n. 27, p. 76-83, 2009.

RASCHE, W. D. Formulação e Análise De Gel-Creme Hidratante Facial. 2014. 19f. Relatório (Curso Técnico em Química)- Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, Novembro de 2014.

ROCA, I., AKOVA, M., BAQUERO, F., CARLET, J., CAVALERI, M., COENEN, S., COHEN, J., FINDLAY, D., GYSSENS, I., HEUER, O.E., KAHLMETER, G., KRUSE, H., LAXMINARAYAN, R., LIÉBANA, E., LÓPEZ-CERERO, L., MACGOWAN, A., MARTINS, M., RODRÍGUEZ-BAÑO, J., ROLAIN, J.M., SEGOVIA, C., SIGAUQUE, B., TACCONELLI, E., WELLINGTON, E., VILA, J.,. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infections*, v.6, p. 22–29. 2015.
RIBEIRO, J. C. *Cosmetologia Aplicada a Dermoestética* Pharmabooks, 2a edição. 2010.

RODRIGUEZ, J. A. G.; CANTÓN R.; SÁNCHEZ E. G.; GÓMEZ-LUS M. L.; MARTÍNEZ L. M. ; RODRÍGUEZ-AVIAL, C.; VILA J. Procedimentos em microbiologia clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos, 2000. Disponível em: < <http://www.seimc.org/protocolos/cap11.htm> > Acesso em: julho de 2018.

ROSS JI, EADY EA, COVE JH, *et al.* Clinical resistance to erythromycin and clindamycin in cutaneous propionibacteria isolated from acne patients is associated with mutations in 23 S rRNA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.41,p. 1162-1165, 1997.

ROSS JI, EADY EA, COVE JH, ET AL. 16 S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, p.1702-1705, 1998.

ROSS JI, EADY EA, CARNEGIE E, ET AL. Detection of transposon Tn5432-mediated macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) resistance in cutaneous propionibacteria from six European cities. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, v. 49 p.165-168, 2002.

RUSCHEL, C. F.; CHIELLA C. ; HUANG T.E.; SAMIOS D. e FERRÃO, M. F. Análise Exploratória Aplicada A Espectros De Reflexão Total Atenuada No Infravermelho Com Transformada De Fourier (Atr-Ftir) De Blendas De Biodiesel/Diesel. *Química Nova*, v.37, n. 5, p. 810-815, 2014.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.

SALAGER, J.L. Emulsion Properties and Related Know-how to Attain Them. France: Marcel Dekker Inc. *Pharmaceutical emulsions and suspensions*, cap 2 and 3, feb 2000.

SALVIA-TRUJILLO L., QIAN C.,MARTÍN-BELLOSO O.,MCCLEMENTS D., J. Modulating - Carotene bioaccessibility by controlling oil composition and concentration in edible nanoemulsions. *Food Chemistry*, v. 139, p.878–84, 2013.

SALVIA-TRUJILLO, L., A.Grau, R. Fourtuny, O. Belosso Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocolloids*, v.43, p 547-556, 2015.

SARKER, D.K. Engineering of nanoemulsions for drug delivery. *Current Drug Delivery*, vol. 2, 2005.

SCHAFFAZICK, S. R. E SÍLVIA, S. G., FREITAS, L. DE L. E POHLMANN A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHOLZ C. F. P. AND KILIAN M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.66, p. 4422–4432, 2016.

SCHERER R.; WAGNER R.; DUARTE M.C.T.; GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.11, n.4, p. 442-449, 2009.

SCHULLER, R.; ROMANOWSKY, P. Understanding emulsions. *Cosmetic & toiletries*, v. 113, n. 09, p.39-44, 1998.

SCHWALBE R.; STEELE-MOORE L.; GOODWIN A.C. Antimicrobial Susceptibility-Testing Protocols. CRC Press. 2007

SHARMA, R.; KISHORE N.; HUSSEIN A. and LALL, N. Antibacterial and anti-inflammatory effects of *Syzygium jambos* L. (Alston) and isolated compounds on acne vulgaris. *Complementary and Alternative Medicine*, v. 13: p.292, 2013.

SECCHI F. L.; VERRUCK S.; KROHN M.; SCHMIDT A. R.; SILVEIRA S. M.; CUNHA JR. A.; e SCHEUERMANN G. N. Composição química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas de ocorrência em Concórdia/SC. 5ª Jornada de Iniciação Científica Embrapa - JINC 57, 2011.

SINHA S.; JOTHIRAMAJAYAM M.; GHOSH M.; MUKHERJEE A. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*, v. 68, p. 71–77, 2014.

SILVA, M.T.N.; USHIMARU, P.I.; BARBOSA, L.N.; CUNHA, M.L.R.S.; FERNANDES JUNIOR, A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.11, n.3, p.257-262, 2009.

SONDI I. and SALOPEK-SONDI B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* v. 275; p. 177–182, 2004.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por *espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. Química Nova*, v. 35, n. 223, 2012

SOUZA, C. S. Uma guerra quase perdida. *Revista Ciência Hoje*, v. 23, n. 138, p. 27-35, 1998.
THADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nanoemulsions. *Advances in Colloids and Interface Science*, v.108 –109, p. 303-318, 2004.

TAHERIKALANI M.; HASSANZADAZAR H.; BAHMANI M.; BAHARVAND-AHMADI B.; RAFIEIAN-KOPAEI M. Staphylococcus Phytotherapy: An overview of the most important Iranian native medicinal plants effective on *Staphylococcus aureus*. *Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences*, v. 9, p.16-23, 2016

TENNYSON, S.; SAMRAJ, D.A.; JEYASUNDAR, D.; CHALIEU, K.. Larvicidal efficacy of plant oils against the dengue vector *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: culicidae). *Middle-East Journal Science and Research*, v.13, p. 64–68, 2013.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, v. 119, n.6, 2006.

TOHIDPOUR, A.; SATTARI, M.; OMIDBAIGI, R.; YADEGAR, A.; NAZEMI, J. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*, v.17, n.2, p. 142–145, 2010.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential Oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science*, Jun 2014.

TORTORAG, J.; FUNK, B.R.; CASE, C.L. Microbiology an introduction. Benjamin/Cummings, 5th edition 1995.

VAN DE BRAAK, S.A.A.J., LEIJTEN, G.C.J.J. Essential Oils and Oleoresins: A survey in the Netherlands and other major markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, p. 116, 1999.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D. J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *Journal of Chromatography A*, v. 11, p. 463-471, 1963.

WILLIAMS, H. C., DELLAVALLE, R. P. & GARNER, S. Acne vulgaris. *Lancet*, v. 379, p. 361-372, 2012.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WALSH, C. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. Washington: ASM Press, 2003. 345p.
WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; MCCLEMENTS, J. Functional Materials in Food Nanotechnology. *Journal of Food Science*, v. 71, n. 9, p. 107-116, 2006.

WEBBER J. S., LAVAYEN V. Formação e caracterização de nanopartículas de prata. XXIX Salão de iniciação científica da UFRGS, 2017

WEN-CHIEN L. ; DA-WEI H. ; CHIUN-C.R. W.; CHING-HUA Y. ; JEN-CHIEH T.,; YU-TING H.; PO-HSIEN L. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. Journal of food and drug Analysis, v.26 p.82-89, 2018.

WILKINSON, J.M., HIPWELL, M., RYAN, T., CAVANAGH, H.M.A. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and antifungal activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.51, p. 76– 81., 2003.

WHO, Food safety and foodborne illness. World Health Organization Fact sheet 237, revised January 2002.

WOOSTER, T.J; GOLDING, M; SANGUARNARI, P. Impact of oil type on nanoemulsions formation and Ostwald Ripening stability. American Chemical Society, v. 24, p. 12758-12765, 2008.

WORZAKOWSKA, MARTA - TG/FTIR/QMS studies of long chain esters of geraniol. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, v. 110, p. 181–193, 2014.

YUE, J. ; WANWEN C.; XIAOLI L., QIXING J.; WENSHUI X. L. Geraniol grafted chitosan oligosaccharide as a potential antibacterial agent. Carbohydrate Polymers, v. 176, p.356–364, 2017.

YUAN, Y.; LI, S.M.; MO, F.K; ZHONG, D.F. Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam. International Journal of Pharmaceutics, v. 321, p. 117-123, 2006.

ZANIN, S.M.W; CHIMELLI, M.C; OLIVEIRA, A. B. Determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo de óleos de origem vegetal. Visão Acadêmica, v. 3, n.1, p. 13-18, 2002.

ZANON, A. B. Aspectos teóricos e práticos sobre a avaliação da estabilidade de emulsões manipuladas em farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

ZHANG X. F. , LIU Z. G. , SHEN W. AND GURUNATHAN S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. International Journal of Molecular Sciences, v.17, p. 1534; 2016.

ZHENG M., HUANG X. Nanoparticles Comprising a Mixed Monolayer for Specific Bindings with Biomolecules. Journal of the American Chemical Society, v.126, n.38, p. 12047-12054, 2004.

ZIANI K., CHANG Y., MCLANDBOROUGH L., MCCLEMENTS D.J. Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized oil nanoemulsions. Journal of Agriculture, Food and Chemistry, v. 59, n.11, p. 6247–6255, 2011.

ZIMERMAN, R. A. Uso Indiscriminado de Antimicrobianos e Resistência Microbiana. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos / MS Edição N° 03, 2010