



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DE IMPERATRIZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E TECNOLOGIA

GABRIEL SOUSA BRITO

NANOEMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Ocimum gratissimum*, *Cymbopogon citratus* e *Lippia alba* e ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

IMPERATRIZ

2024

GABRIEL SOUSA BRITO

NANOEMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Ocimum gratissimum*, *Cymbopogon citratus* e *Lippia alba* e ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Tecnologia. Área de concentração: Saúde e Tecnologia. Linha de Pesquisa: tecnologia em saúde.

Orientador: Profa. Dra. Queli Cristina Fidelis.
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Holanda.

IMPERATRIZ-MA

2024

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Brito, Gabriel Sousa.

Nanoemulsões de óleos essenciais de *Ocimum gratissimum*,
Cymbopogon citratus e *Lippia alba* e atividade
antibacteriana /
Gabriel Sousa Brito. - 2024.
105 f.

Coorientador(a) 1: Carlos Alexandre Holanda.

Orientador(a): Queli Cristina Fidelis.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde e Tecnologia/ccim, Universidade Federal do Maranhão,
Imperatriz, 2024.

1. Nanoemulsão. 2. Óleo Essencial. 3. Atividade
Antibacteriana. I. Fidelis, Queli Cristina. II. Holanda,
Carlos Alexandre. III. Título.

GABRIEL SOUSA BRITO

NANOEMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Ocimum gratissimum*, *Cymbopogon citratus* e *Lippia alba* e ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Tecnologia. Área de concentração: Saúde e Tecnologia. Linha de Pesquisa: tecnologia em saúde.

Aprovada em: 29/04/2024.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Queli Cristina Fidelis (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof. Dr. Geovany Amorim Gomes
Universidade Estadual do Vale do Acaraú (UVA)

Profa. Dra. Márcia Cristina Gonçalves Maciel
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

A Deus.

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todas as pessoas que me ajudaram a concluir este trabalho. Agradeço primeiramente a Deus, por suas bênçãos, que me deram força e perseverança para concluir este trabalho. Por me conceder o dom da vida, as oportunidades e a chance de sonhar e realizá-los. Agradeço por cada adversidade que me ajudou a me fortalecer e amadurecer.

Aos meus pais, Manoel Costa Brito e Eliane Sousa Brito, pelo apoio e confiança em mim depositada. À querida Iranilda Silva Nunes, expresso minha profunda gratidão por incentivar meus sonhos, por ser meu porto seguro, meu apoio e minha força. Agradeço por viver comigo cada escolha e por me ajudar a crescer como pessoa.

A Professora Doutora Queli Cristina Fidelis e ao Professor Dr. Carlos Alexandre Holanda pela orientação, conselhos que me ajudaram a chegar ao fim deste trabalho e contribuíram para o meu crescimento profissional. Agradeço pela orientação, confiança, respeito e amizade que me foram oferecidos.

Agradecimento especial à amiga Jaqueline Barros pela colaboração para o desenvolvimento desta dissertação. Agradeço pela ajuda desde o experimento, bem como o apoio amigo nos momentos difíceis.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Química de Produtos Naturais pelo apoio e troca de conhecimentos. Além disso, ao Professor Dr. Richard Pereira Dutra pelo apoio e a amizade.

Ao professor Dr. Aramys Silva Reis e Fernanda Farias Costa, do Laboratório de Fisiopatologia e Investigação Terapêutica, pelo apoio, disponibilização de espaço e equipamentos para análises biológicas.

Ao PPGST e à Universidade Federal do Maranhão, pelo apoio financeiro e estrutura física.

À Coordenação de Apoio de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de mestrado, viabilizando minha dedicação exclusiva a esta pesquisa.

RESUMO

As nanoemulsões são dispersões coloidais que podem ser divididas em três tipos, Óleo/Água, Água/Óleo e bicontínuas, dependendo se o óleo ou a água é utilizada como fase dispersa. A formação de nanoemulsões com óleos essenciais (NEs-OEs) apresenta vantagens, como proteção contra reações químicas envolvendo o oxigênio na degradação dos OE, aumento da solubilidade na fase aquosa, liberação controlada dos óleos e aumento da bioatividade devido ao aumento da área superficial da emulsão. O presente estudo contempla uma revisão integrativa da literatura e o desenvolvimento de NEs-OEs de três espécies aromáticas, *Lippia alba*, *Cymbopogon citratus* e *Ocimum gratissimum*. A revisão integrativa visou identificar as evidências científicas que corroboram a ação antimicrobiana de NEs-OEs contra microrganismos patogênicos resistentes a antibióticos. Dessa forma, foram selecionados onze artigos científicos de avaliação antibacteriana ou antifúngica de NEs-OEs. A síntese das evidências identificadas mostrou que essas nanoemulsões são eficazes no combate de microrganismos multirresistentes e na formação de seus biofilmes. Fatores como tamanho de gotícula da nanoemulsão, composição química de OEs e a associação de nanoemulsões com antibióticos são discutidos. As nanoemulsões também apresentaram resultados satisfatórios em avaliações *in vitro* e *in vivo* contra isolados clínicos resistentes. As NEs-OEs de *O. gratissimum*, *L. alba* e *C. citratus* foram formadas utilizando metodologia de temperatura de inversão de fases. Um delineamento experimental composto rotacional foi usado para produzir as NEs de cada óleo e a metodologia de superfície de resposta (RSM) foi utilizada para otimizar as condições de sua preparação. Neste estudo, os efeitos da concentração do OE (0,5-2,0 g/L), concentração do surfactante (0,2-5 g/L) e temperatura (26-94 °C) na variável resposta ϕ ($\epsilon_{\max}/\lambda_{\max}$) foram investigadas utilizando RSM baseado em planejamento de composto central (CCD), para avaliar a significância dos parâmetros de produção e identificar a condição ideal que impactou significativamente a produção das NEs. A otimização das NEs-OEs revelou que as concentrações do OE e surfactante, e temperaturas para *O. gratissimum* (1,38 g/L, 0,83 g/L e 54 °C), *L. alba* (1,72 g/L, 0,68 g/L e 54 °C) e *C. citratus* (1,20 g/L, 0,78 g/L e 54 °C) produziram nanoemulsões ideais. A NE otimizada de *C. citratus* apresentou tamanho médio de partícula de 287,9 nm, PDI de 0,42 e potencial Zeta de - 8,94 mV. Ademais, os OEs e as NEs otimizadas foram avaliados quanto à atividade antibacteriana, onde as NEs exibiram maior bioatividade que os OEs puros contra as cepas patogênicas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecali*, apresentando maior efeito bacteriostático e inibitório. Dentre as cepas, a *E. faecali* foi mais suscetível as NEs de *C. citratus* e *O. gratissimum* com concentração inibitória mínima de 0,075 mg/mL e 0,172 mg/mL, respectivamente. A nanoemulsão potencializou o efeito bactericida do OE de *L. alba*, reduzindo CIM do OE puro de 8 mg/mL para 0,445 mg/mL. Além disso, as NEs apresentaram baixa citotoxicidade em macrófagos RAW 264,7. Os resultados desta pesquisa podem fornecer informações úteis no desenvolvimento de NEs pela metodologia de inversão fase e os dados da ação antibacteriana dessas formulações podem ser úteis no desenvolvimento de um potencial agente antibacteriano.

Palavras-chave: Nanoemulsão. Óleo essencial. Atividade antibacteriana

ABSTRACT

Nanoemulsions are colloidal dispersions that can be divided into three types, Oil/Water, Water/Oil and bicontinuous, depending on whether oil or water is used as the dispersed phase. The formation of nanoemulsions with essential oils (NE-OE) presents advantages, such as protection against chemical reactions involving oxygen in the degradation of EOs, increased solubility in the aqueous phase, controlled release of bioactive compounds and increased bioactivity due to the increase in surface area of the emulsion. The present study includes an integrative review of the literature and the development of an essential oil nanoemulsion from three aromatic species, *Lippia alba*, *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum*. The integrative review aimed to identify scientific evidence that corroborates the antimicrobial action of essential oil nanoemulsions against antibiotic-resistant pathogenic microorganisms. By applying the integrative review methodology, eleven scientific articles on the antibacterial or antifungal evaluation of essential oil nanoemulsions were selected. The synthesis of the identified evidence showed that essential oil nanoemulsions are effective in combating multi-resistant microorganisms and in the formation of their biofilms. Factors such as nanoemulsion droplet size, chemical composition of essential oils and the association of nanoemulsions with antibiotics are discussed. Furthermore, essential oil nanoemulsions showed satisfactory results in in vitro and in vivo evaluations against resistant clinical isolates. Nanoemulsions of essential oils from *Ocimum gratissimum*, *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* were formed using phase inversion temperature methodology. A rotational composite experimental design was used to produce the nanoemulsions of each oil and response surface methodology (RSM) was used to optimize the nanoemulsion preparation conditions. In this study, the effects of essential oil concentration (0.5-2.0 g/L), surfactant concentration (0.2-5 g/L) and temperature (26-94 °C) on the response variable ϕ ($\epsilon_{\max}/\lambda_{\max}$) were investigated. using RSM based on central compound planning (CCD), to evaluate the significance of production parameters and identify the ideal condition that significantly impacted the production of nanoemulsions. The optimization of essential oil nanoemulsions revealed that the concentration of essential oil, surfactant and temperatures for *Ocimum gratissimum* (1.38 g/L, 0.83 g/L and 54 °C), *Lippia alba* (1.72 g/L, 0.68 g/L and 54 °C) and *Cymbopogon citratus* (1.20 g/L, 0.78 g/L and 54 °C) produced ideal nanoemulsions. The optimized *C. citratus* NE showed an average particle size of 287.9 nm, PDI of 0.42 and Zeta potential of – 8.94 mV. Furthermore, essential oils and optimized nanoemulsions were evaluated for antibacterial activity, where NEs exhibited more potent antibacterial activity than pure essential oil against the pathogenic strains *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecali*, showing greater effect bacteriostatic and inhibitory. Among the strains, *E. faecali* was more susceptible to NEs from *C. citratus* and *O. gratissimum* with a minimum inhibitory concentration of 0.075 mg/mL and 0.172 mg/mL, respectively. The nanoemulsions enhanced the bactericidal effect of *L. alba* essential oils, reducing the MIC of the pure essential oil from 8 mg/mL to 0.445 mg/mL. Furthermore, they showed low cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages. The results of this research can provide useful information in the development of nanoemulsions using phase inversion methodology and the antibacterial activity data of essential oils can be useful in the development of a potential antibacterial agent.

Keywords: Nanoemulsion. Essential oil. Antibacterial activity.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1	- Representação esquemática da estrutura das nanoemulsões A/O e O/A	06
Figura 2	- Representação esquemática dos principais métodos de baixa energia para nanoemulsificação	10
Figura 3	- Delineamento Composto Central (CCD) de três fatores com valores codificados	15
Figura 4	- Box–Behnken design.....	16

Capítulo I Nanoemulsions of essential oils against multi-resistant microorganisms: an integrative review

Figura 1	- Selection flowchart of studies, according to PRISMA recommendation	23
Figura 2	- Representation of mechanism of antibacterial activity of EO	31
Figura 3	Biofilm development stages involve (I) cell attachment	34

Capítulo 2 Atividade antibacteriana das nanoemulsões dos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum*, *Cymbopogon citratus* e *Lippia alba*

Figura 1	- Gráficos de perturbação mostrando o efeito de variáveis independentes nas propriedades das nanoemulsões.....	60
Figura 2	- Gráficos de superfícies de resposta do NE de a) <i>Lippia alba</i> , b) <i>O. gratissimum</i> e c) <i>C. citratus</i> onde a influência de A (OE) e B (surfactante) sob a resposta (φ).....	62
Figura 3	- Gráficos de superfícies de resposta do NE de a) <i>Lippia alba</i> , b) <i>O. gratissimum</i> e c) <i>C. citratus</i>	63
Figura 4	- Gráficos de superfícies de resposta do NE de a) <i>O. gratissimum</i> e b) <i>C. citratus</i> onde a influência de C (temperatura) e A (OE) sobre a resposta (φ)	64
Figura 5	- Gráfico de estabilidade das nanoemulsões a) <i>O. gratissimum</i> b) <i>L. alba</i> c) <i>C. citratus</i>	65
Figura 6	- Viabilidade celular do óleo essencial puro.....	70

LISTA DE TABELAS

Capítulo I	Nanoemulsões de óleos essenciais contra microrganismos multirresistentes: uma revisão integrativa	
Tabela 1	- . Search strategies in the databases used in the study according to the databas	22
Tabela 2	- Antimicrobial activities of NE against multi-resistant microorganism	24
Tabela 3	Antifungal activities of NE against multiresistent microorganims	31
Capitulo 2	Atividade antibacteriana das nanoemulsões dos óleos essenciais de <i>Ocimum gratissimum</i>, <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Lippia alba</i>	
Tabela 1	- Níveis reais em níveis fatoriais codificados das variáveis independentes utilizadas no RSM	53
Tabela 2	- Composição química dos óleos essenciais de folhas <i>Ocimum gratissimum</i> , <i>Lippia alba</i> e <i>Cymbopogon citratus</i>	55
Tabela 3	- Modelo polinomial de segunda ordem das nanoemulsões de <i>Lippia alba</i> , <i>Ocimum gratissimum</i> e <i>Cymbopogon citratus</i>	57
Tabela 4	- Análise dos dados de variância dos coeficientes de regressão das equações quadráticas ajustadas para variáveis respostas.	59
Tabela 5	- Os pontos ótimos selecionados para validação de amostras de nanoemulsão.	64
Tabela 6	- Resultados de CIM e CBM dos óleos essenciais e nanoemulsões para bactérias patogênicas (mg/mL)	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NE	Nanoemulsão
OE	Óleo essencial
O/A	Óleo em água
CCD	Projeto Composto Central
BBD	Box-Behnken
PIT	Phase Inversion Temperature
rpm	Rotações por minutos
mL	Mililitros
mg	Miligramas
g	Gramas
h	Horas
µg	Microgramas
°C	Graus Celsius
CG	Cromatografia Gasosa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
EM	Espectrometria de massa
La	<i>Lippia alba</i>
Og	<i>Ocimum gratissimum</i>
Cc	<i>Cymbopogon citratus</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

φ	Variável Resposta
%	Porcentagem
ε	Coeficiente de extinção
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 Classificação das emulsões.....	4
3.2 Composição de Nanoemulsão	4
3.3 Métodos de preparação de nanoemulsões	6
3.3.1 Abordagens de alta energia	7
3.3.2 Abordagens de baixa energia	8
3.3.3 Estabilidade de nanoemulsões	10
3.4 Projetos Experimentais	11
3.4.2 Planejamento fatorial completo e fracionário.....	13
3.4.3 Projeto composto central (CCD)	14
3.4.4 Box–Behnken design.....	15
CAPÍTULO 1 - Nanoemulsions of essential oils against multi-resistant microorganisms: an integrative review	18
1. Introduction	20
2. Material and methods	21
3. Results and discussion.....	22
4. Conclusions	38
CAPITULO 2 – Avaliação das atividades antibacteriana e citotóxica de nanoemulsões dos óleos essenciais de <i>Ocimum gratissimum</i>, <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Lippia alba</i>	48
1. Introdução	49
2. Material e métodos	50
2.1 Coleta e extração de óleo essencial	50
2.2 Composição química dos óleos essenciais	50
2.3 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais e das nanoemulsões	51

2.4 Preparo das Nanoemulsões	52
2.5 Caracterização das nanoemulsões	52
2.6 Delineamento Composto Central (CCD) usado para a obtenção das nanoemulsões de OEs	52
2.7 Ensaio de viabilidade celular	53
2.8 Análise estatística	54
3. Resultados e discussões	54
3.1 Composição química dos óleos essenciais	54
3.2 ANOVA das variáveis de obtenção de nanoemulsões	56
3.3 Otimização das NEs por Superfície de Resposta.....	61
3.4 Estabilidade das nanoemulsões	65
3.5 Propriedades físico-químicas das nanoemulsões otimizadas	66
3.6 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais e nanoemulsões.....	66
Bactérias	67
3.7 Avaliação da citotoxicidade das nanoemulsões	69
4 Conclusão	71
Referências	72
REFERÊNCIAS	77