



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS BASEADAS EM ÓLEOS ESSENCIAIS COM
ATIVIDADE CONTRA ESPÉCIES BACTERIANAS ISOLADAS DE HUMANOS**

Aluna: Elenice Francisco da Silva

Orientadora: Prof^a. Dra. Lígia Nunes de Moraes Ribeiro

Coorientadora: Dra. Luciana Machado Bastos

UBERLÂNDIA - MG

2023



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS BASEADAS EM ÓLEOS ESSENCIAIS COM
ATIVIDADE CONTRA ESPÉCIES BACTERIANAS ISOLADAS DE HUMANOS**

Aluna: Elenice Francisco da Silva

Orientadora: Prof^a. Dra. Lígia Nunes de Moraes Ribeiro

Coorientadora: Dra. Luciana Machado Bastos

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Bioquímica)

UBERLÂNDIA - MG

2023



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586 Silva, Elenice Francisco da, 1983-
2023 Nanopartículas lipídicas baseadas em óleos essenciais
com atividade contra espécies bacterianas isoladas de
humanos [recurso eletrônico] / Elenice Francisco da
Silva. - 2023.

Orientadora: Lígia Nunes de Moraes Ribeiro.

Coorientadora: Luciana Machado Bastos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.424>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Ribeiro, Lígia Nunes de Moraes, 1986-,
(Orient.). II. Bastos, Luciana Machado, 1978-,
(Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia.
Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico - PPGGB				
Data:	30/08/2023	Hora de início:	09:00h	Hora de encerramento:	09:30h
Matrícula do Discente:	12122GBI009				
Nome do Discente:	Elenice Francisco da Silva				
Título do Trabalho:	Nanopartículas lipídicas baseadas em óleos essenciais com atividade contra espécies bacterianas isoladas de humanos.				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Nanobiotechnology				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Carreadores lipídicos nanoestruturados de origem natural com atividade contra espécies bacterianas multirresistentes isoladas de humanos.				

Aos trinta dias do mês de agosto de dois mil e vinte e três, às 09:00 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma Cisco Webex, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Lígia Nunes de Moraes Ribeiro (Orientadora), Simone Ramos de Castro e Belchiolina Beatriz Fonseca. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Lígia Nunes de Moraes Ribeiro apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor (a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(A) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Belchiolina Beatriz Fonseca, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/08/2023, às 14:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lígia Nunes de Moraes Ribeiro, Usuário Externo**, em 30/08/2023, às 14:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Simone Ramos de Castro, Usuário Externo**, em 30/08/2023, às 15:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4701242** e o código CRC **ABD6FC86**.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS BASEADAS EM ÓLEOS ESSENCIAIS COM
ATIVIDADE CONTRA ESPÉCIES BACTERIANAS ISOLADAS DE HUMANOS**

ALUNA: Elenice Francisco da Silva

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^ª. Dra. Lígia Nunes de Moraes Ribeiro (Orientadora)

Examinadores:

Dra. Belchiorina Beatriz Fonseca

Dra. Simone Ramos de Castro

Data da Defesa: 30 / 08 / 2023

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

(Prof^ª. Dra. Lígia Nunes de Moraes Ribeiro)

Dedico este trabalho aos meus pais, **Alceo** e **Sirlei**, pelo exemplo de coragem, amor e força.

Dedico também ao meu esposo **Guilherme** e ao meu filho **Pedro** pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela saúde, força e resiliência. Gratidão pela vida e pela oportunidade de estar em constante aprendizado.

Aos meus pais, Alceo e Sirlei pelo cuidado, amor, ensinamentos e exemplo de fé e coragem. Minha eterna gratidão a vocês.

Ao meu esposo Guilherme pelo companheirismo e incentivo.

Ao meu filho Pedro por trazer alegria aos meus dias.

Agradeço imensamente à minha orientadora Lígia pela confiança, acolhimento, incentivo, ensinamentos, oportunidade e preocupação com cada detalhe.

À minha coorientadora Luciana pela acolhida, apoio e disponibilidade em me auxiliar durante todo o processo.

À Dra. Rosineide Marques Ribas, coordenadora do Laboratório de Microbiologia Molecular Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho/ICBIM/UFU por ter cedido as cepas bacterianas necessárias para a pesquisa.

Ao Laboratório de Nanobiotecnologia/IBTEC/UFU e ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas/FAMEV/UFU por terem me estendido à mão, proporcionando um ambiente acolhedor e produtivo, além de disponibilizar reagentes e equipamentos.

Ao Laboratório de Multiusuários do Instituto de Química/UFU pelos equipamentos disponibilizados.

Ao PPGGB, seus professores e colaboradores, por terem me proporcionado tanto aprendizado e suporte.

À CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa.

À UFU por toda estrutura acadêmica e por manter ativa a pesquisa científica com professores de alto nível.

À Agência Intelecto/UFU pela avaliação e pelas orientações necessárias durante todo o processo de comunicação de invenção e depósito de Patente.

Aos membros da Comissão Examinadora por aceitarem o convite, pelas contribuições realizadas e pelo tempo dispensado para auxiliar no enriquecimento deste trabalho.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente participaram dessa experiência.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	8
CAPÍTULO I: Fundamentação Teórica	9
1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	10
2 ÓLEOS ESSENCIAIS	12
3 NANOTECNOLOGIA COMO FERRAMENTA PARA ENTREGA DE PRODUTOS NATURAIS.....	14
4 OPINIÃO CRÍTICA	19
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	21
CAPÍTULO II: Nanopartículas lipídicas baseadas em matrizes naturais com atividade contra cepas multirresistentes isoladas de humanos	22
RESUMO.....	23
ABSTRACT	24
1 INTRODUÇÃO.....	25
2 MATERIAIS	28
3 METODOLOGIA	29
3.1 <i>Screening</i> dos óleos naturais.....	29
3.2 Preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC)	30
3.3 Estudo da estabilidade físico-química.....	30
3.4 Caracterização estrutural das formulações de NLC.....	31
3.5 Teste da Concentração Inibitória Mínima	32
3.6 Ensaio de nanotoxicidade <i>in vivo</i> em modelo de embrião de galinha..	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5 CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS	53

APRESENTAÇÃO

A resistência antimicrobiana é uma ameaça à saúde pública mundial, gerando preocupação para as autoridades e profissionais da saúde. Há evidências de uma progressiva disseminação de bactérias multirresistentes que, por serem resistentes à maioria dos tratamentos comercialmente disponíveis, limitam a terapia e aumentam o índice de mortalidade. Como fator agravante, observa-se tempo prolongado de hospitalização e utilização de antibióticos de última geração em doses elevadas, aumentando sua toxicidade e contribuindo para a seleção de bactérias ultrarresistentes, além de elevar os custos hospitalares.

Existe claramente uma crescente necessidade da descoberta de novos compostos antimicrobianos, em particular antibacterianos, que possam agir contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, combatendo os principais tipos de infecções.

Neste sentido, o emprego da nanotecnologia no desenvolvimento de formulações para a entrega sustentada de antimicrobianos é uma alternativa promissora. Acredita-se que o desenvolvimento de formulações de carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) compostas por excipientes naturais e de grande abundância no Brasil, como os óleos essenciais (OE) e vegetais, pode trazer benefícios e novas perspectivas à terapia antimicrobiana. Além disso, aliados a um baixo custo de produção, possibilidade de escalonamento e sendo economicamente viável, poderia ser incorporada ao sistema único de saúde (SUS) como futuro tratamento e sanitização de ambientes hospitalares.

O objetivo desta dissertação é apresentar uma visão geral sobre resistência bacteriana e demonstrar o potencial de formulações desenvolvidas a partir de matrizes naturais como parte de uma pesquisa original que almejou desenvolver uma opção terapêutica barata e eficaz contra infecções por bactérias multirresistentes. Para fins didáticos, este trabalho foi dividido em dois capítulos. O primeiro, fornece uma revisão teórica contendo informações relevantes para a compreensão do presente trabalho. Já o Capítulo 2, refere-se ao estudo experimental que objetivou desenvolver NLC compostos por manteigas vegetais que encapsularam OE com atividade contra cepas de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* isoladas de humanos. Neste capítulo, são apresentadas as metodologias utilizadas, os resultados, discussões e conclusões.

CAPÍTULO I: Fundamentação Teórica

1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência antimicrobiana (RAM) é uma das principais ameaças globais à saúde pública do século XXI. Ocorre quando os microrganismos desenvolvem a capacidade de resistir à ação dos antimicrobianos, tornando-os menos efetivos ou ineficientes para combater infecções (Murray *et al.*, 2022). Existem evidências que o uso excessivo de antimicrobianos contribuiu para o desenvolvimento da RAM, aumentando sua taxa de disseminação (O'Neill, 2016). A consequência é um cenário extremamente preocupante devido ao aparecimento de bactérias multirresistentes (MDR) aos tratamentos considerados “última linha de defesa”, que incluem vancomicina, polimixina B, carbapenêmicos e colistina (Wang *et al.*, 2022; Yao *et al.*, 2023).

Ao longo dos anos, as bactérias desenvolveram vários mecanismos de resistência para dificultar a ação dos antibióticos. Estes mecanismos envolvem mutações genéticas, transmissão vertical de cromossomos, transmissão horizontal de plasmídeos ou transposons, captura de genes de resistência exógena por integrons, alterações no sítio-ativo do antibiótico (Yao *et al.*, 2023), redução da permeabilidade da membrana externa, expressão de bombas de efluxo e produção de enzimas para degradar os antibióticos (Andrade; Darini, 2017).

Infecções por patógenos multirresistentes estão associadas a um aumento considerável de morbidade e mortalidade em unidades de terapia intensiva (UTI) em todo o mundo (Braga *et al.*, 2018), além de elevar os custos hospitalares. Segundo pesquisa realizada por Osme *et al.* (2020), as infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) causadas por bactérias resistentes aos principais tratamentos farmacológicos, representaram um aumento de 75 % no tempo de internação dos pacientes, quando comparados aos sem IRAS. Além disso, o custo direto dos pacientes com IRAS foi 111,5 % maior que o valor reembolsado pelo Sistema Único de Saúde brasileiro (SUS), com custo direto extra de US\$ 11.776 por paciente, extremamente altos principalmente quando envolveram infecções associadas a *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos.

Segundo estimativa publicada em 2019, cerca de 1,27 milhão de mortes foram atribuídas à resistência bacteriana nesse ano, sendo os seis principais

patógenos: *Escherichia coli*, seguida por *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (Murray *et al.*, 2022). Os desafios para o tratamento dessas infecções são enormes, principalmente quando biofilmes estão envolvidos. Quando as bactérias estão organizadas em biofilmes, há um aumento na sua capacidade de resistir à ação dos antibióticos em comparação com as células planctônicas sendo que, para o estabelecimento efetivo do biofilme, as bactérias se comunicam por meio do *quórum-sensing* (Panda *et al.*, 2022).

Recentemente, o mundo todo enfrentou a pandemia da COVID-19 e vários relatórios mostraram aumento de infecções hospitalares por microrganismos resistentes neste período, com destaque para *A. baumannii* e enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, *Enterococcus ssp.* resistente à vancomicina, *P. aeruginosa* MDR e *S. aureus* resistente à meticilina (Micheli *et al.*, 2023). Como consequência, houve um aumento no consumo de antibióticos de amplo espectro, como vancomicina e polimixinas B e E (Freire *et al.*, 2023) associados a terapias antimicrobianas empíricas (Micheli *et al.*, 2023; Rawson; Wilson; Holmes, 2021), o que potencialmente atua como estímulo para o desenvolvimento de RAM (Kariyawasam *et al.*, 2022).

A literatura aponta que a maioria dos antibióticos aprovados nos últimos anos são provenientes de pesquisas realizadas antes de 2010 (Yao *et al.*, 2023), sendo urgente a descoberta de novos tratamentos. Em virtude disso, pesquisas foram intensificadas para enfrentar esse desafio, buscando desenvolver novas opções terapêuticas que sejam eficazes e seguras. Assim como a estratégia global, deve-se concentrar na busca de novas opções terapêuticas contra tuberculose, bactérias Gram-negativas MDR e extensivamente resistentes (XDR) a medicamentos (Tacconelli *et al.*, 2018).

Nesse sentido, alguns materiais poliméricos, peptídeos antibacterianos e sistemas de entrega sustentada de moléculas (DDS) utilizando nanotecnologia têm demonstrado grande potencial para superar a resistência bacteriana (Yao *et al.*, 2023). Assim, têm sido exploradas abordagens promissoras envolvendo produtos naturais, como os óleos essenciais (OE) para combater infecções relacionadas com *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*

(Panda *et al.*, 2022), mas devido algumas propriedades físico-químicas como alta volatilidade, sensibilidade à luz (Guidotti-Takeuchi *et al.*, 2022), toxicidade (Dajic Stevanovic *et al.*, 2020), hidrofobicidade e instabilidade causada por hidrólise e oxidação (Cimino *et al.*, 2021) sua aplicação biomédica é limitada.

Para superar essas desvantagens, algumas abordagens nanotecnológicas que permitem o encapsulamento de moléculas bioativas podem ser aplicadas (Dajic Stevanovic *et al.*, 2020; Guidotti-Takeuchi *et al.*, 2022). Dessa forma, a natureza hidrofóbica dos OE os torna compatíveis para serem encapsulados em carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) e, conseqüentemente, os elege como excelentes candidatos para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, aliados ainda ao seu baixo preço e ampla diversidade (Ribeiro *et al.*, 2020b).

2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Desde a antiguidade, substâncias derivadas de plantas, tais como OE e vegetais, são utilizadas em diversos países para propósitos distintos, conforme a cultura de cada lugar (Elshafie; Camele, 2017).

A 7ª edição da Farmacopeia Europeia define OE como “produto aromático de composição complexa, obtido de uma matéria-prima vegetal botanicamente definida por métodos de arraste por vapor d’água, destilação a seco ou por uma técnica mecânica adequada sem aquecimento”. O OE pode ser separado da fase aquosa utilizando um método físico que não altere sua composição química, como a extração à frio (Asbahani *et al.*, 2015).

As características básicas dos OE são o odor marcante, fotossensibilidade e o alto pH (bases fortes) (Dajic Stevanovic *et al.*, 2020). São provenientes do metabolismo secundário das plantas, podendo ser extraídos de diferentes estruturas vegetais: casca, folhas, flores, brotos, sementes, raízes e frutos. Sua constituição química é complexa e vários compostos bioativos podem ser observados em sua composição, que compreende as substâncias orgânicas voláteis de várias classes, como aldeídos, terpenos, terpenoides, ésteres, cetonas, fenólicos e éteres (Swamy; Akhtar; Sinniah, 2016; Tongnuanchan; Benjakul, 2014). Em geral, representam uma pequena fração da composição vegetal e são

constituídos, principalmente, por monoterpenos, sesquiterpenos e terpenoides (Asbahani *et al.*, 2015).

O perfil químico de um OE está fortemente relacionado ao procedimento de extração adotado para sua obtenção (Elshafie; Camele, 2017), sendo importante utilizar um método que mantenha a proporção natural e a composição química mais próxima possível de seu estado original. Existem vários métodos de extração, os quais são classificados em métodos convencionais, baseados na destilação de água por aquecimento, e métodos avançados, que fazem uso de tecnologias inovadoras como ultrassom e micro-ondas. Como os OE são termolábeis, as técnicas convencionais podem comprometer sua qualidade. Além disso, apresentam muitas desvantagens como tempo de extração mais longo, menor eficiência, necessidade de maiores concentrações de solventes orgânicos e maior consumo de energia. Desta forma, os métodos de extração avançados representam uma alternativa para superar as limitações dos métodos convencionais e são mais eficientes em termos de baixo custo, economia de tempo, energia e necessidade de solventes (Asbahani *et al.*, 2015; Kant; Kumar, 2022).

Os constituintes químicos dos OE podem diferir entre as espécies vegetais e alguns fatores, como localização geográfica, ambiente e estágio de maturidade da planta podem afetar a sua composição (Swamy; Akhtar; Sinniah, 2016). Além do mais, a quantidade de OE é diferente entre as plantas, e isso determina e justifica o preço de cada produto (Tongnuanchan; Benjakul, 2014).

Atualmente, os OE têm interesse renovado e pesquisas são desenvolvidas para sua utilização pela indústria cosmética, agrícola, alimentícia e farmacêutica (Chukwuma *et al.*, 2023; Guidotti-Takeuchi *et al.*, 2022). São reconhecidos como compostos naturais promissores para uso como ativo farmacêutico por apresentarem diversas propriedades biológicas intrínsecas, que incluem atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, anticancerígena, analgésica, anti-inflamatória, biopesticida, repelente e dentre outras (Cimino *et al.*, 2021; Elshafie; Camele, 2017).

Os efeitos antibacterianos e antibiofilme dos OE estão relacionados à sua capacidade de penetrar a parede celular bacteriana, afetando sua integridade, induzindo o extravasamento de íons e a ruptura de enzimas, bem como provocando alterações estruturais e funcionais da célula bacteriana, levando-as à morte (Dajic

Stevanovic *et al.*, 2020). Outros mecanismos de ação incluem sua capacidade de afetar a função de bombas de efluxo, inibir a formação de biofilme e a detecção de *quorum sensing* bacteriano (Panda *et al.*, 2022). É importante destacar que, os OE demonstraram baixo potencial para o desenvolvimento de resistência microbiana, provavelmente devido sua composição química complexa contendo múltiplas moléculas bioativas (Angane *et al.*, 2022; Lu *et al.*, 2018).

Alguns OE (cássia, canela, cravo, eucaliptol, lavanda, limão, manjerona, laranja, orégano e hortelã - pimenta) e seus componentes químicos (cinamaldeído, carvacrol, curcumina e eugenol) demonstraram atividade antimicrobiana promissora (Patra *et al.*, 2018), sendo interessante aplicá-los na prevenção de infecções hospitalares por meio do seu uso no processo de desinfecção de dispositivos médicos e superfícies hospitalares (Panda *et al.*, 2022).

Todavia, a aplicação de OE na indústria farmacêutica é limitada em função da sua solubilidade reduzida em água e baixa estabilidade físico-química, devida à elevada volatilidade e capacidade de oxidação (Carbone *et al.*, 2018; Guidotti-Takeuchi *et al.*, 2022). Ainda, efeitos de toxicidade e irritação das mucosas esofágica e gastrointestinal limitam seu uso pela via enteral, bem como reações alérgicas podem ser observadas na pele se não forem suficientemente diluídos (Lammari *et al.*, 2021).

Para superar tais limitações, encapsular o OE pode ser uma alternativa interessante e promissora. Várias técnicas envolvendo o emprego da nanotecnologia para o desenvolvimento de sistemas de liberação de moléculas ativas por carreadores estão sendo utilizadas com sucesso (Asbahani *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2021a; Geronimo *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2021; Scioli Montoto; Muraca; Ruiz, 2020).

3 NANOTECNOLOGIA COMO FERRAMENTA PARA ENTREGA DE PRODUTOS NATURAIS

A nanotecnologia é um campo promissor a ser empregado no desenvolvimento de sistemas de liberação de moléculas-ativas (Ribeiro *et al.*, 2016). Sua aplicação em conjunto com compostos bioativos vem se destacando por diminuir problemas relacionados à toxicidade desses compostos, além de trazer

benefícios em relação à solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade das moléculas, permitindo sua entrega sustentada e direcionada a um alvo específico (Guidotti-Takeuchi *et al.*, 2022). Há evidências também de que a associação de sistemas de liberação com compostos naturais pode ajudar a retardar o desenvolvimento de resistência aos medicamentos. Portanto, poderá desempenhar um papel importante na seleção de novos candidatos para o tratamento de infecções (Patra *et al.*, 2018).

No que tange à eficácia antimicrobiana, existem diferentes sistemas de nanoentrega que demonstraram melhorar a potência de OE. No entanto, duas classes de DDS se destacam: nanopartículas poliméricas, incluindo quitosana, celulose e alginato de sódio, e nanopartículas lipídicas, compreendendo os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC), nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), nanoemulsões, lipossomas e niossomas. Tais nanopartículas despertam interesse por possuírem características biodegradáveis, biocompatíveis e ecologicamente corretas (Dupuis *et al.*, 2022). A Tabela 1 ilustra algumas nanopartículas à base de lipídios que encapsularam OE e apresentaram atividade antimicrobiana promissora.

Neste trabalho nos concentramos em nanopartículas lipídicas (NLC e SLN), cujos arranjos supramoleculares estão ilustrados na Figura 1. Geralmente, esses sistemas são preparados por métodos de emulsificação-ultrasonicação a quente ou homogeneização de alta pressão (Araújo; Ribeiro; Paula, 2019), considerados simples e com facilidade para escalonamento (Lammari *et al.*, 2021). Tais nanopartículas lipídicas são compostas por uma matriz estrutural lipídica, estabilizada por tensoativo, preferencialmente de natureza não-iônica como os poloxamers e polisorbatos (Santos *et al.*, 2012). As SLN foram desenvolvidas na década de 1990, caracterizadas como suspensões de nanopartículas lipídicas compostas por uma matriz formada por lipídios sólidos à temperatura ambiente e dispersas em meio aquoso. Diferentemente, a matriz dos NLC é composta por uma mistura de lipídios sólidos e líquidos à temperatura ambiente (Lammari *et al.*, 2021).

Esses sistemas permitem o encapsulamento de moléculas hidrofóbicas, melhorando sua estabilidade físico-química (Cimino *et al.*, 2021), fundamental para proteger os OE da degradação, evaporação e aumentar sua solubilidade em água, otimizando assim, sua biodisponibilidade, biodistribuição, favorecendo sua

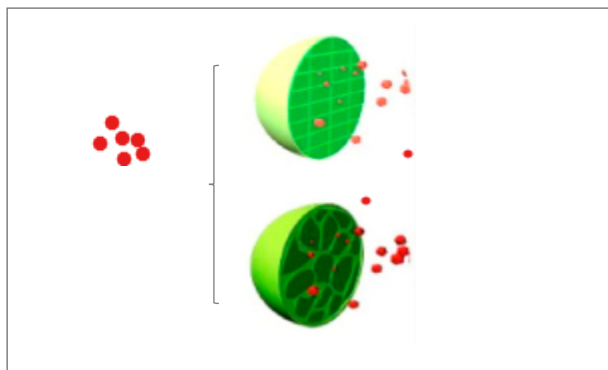
liberação sustentada (Katopodi; Detsi, 2021) e, conseqüentemente, melhorando sua bioatividade (Dajic Stevanovic *et al.*, 2020).

Os sistemas de NLC representam a segunda geração de nanopartículas lipídicas e foram desenvolvidos em 1999 para superar as limitações das SLN, tais como: baixa capacidade de encapsulamento de moléculas e expulsão do composto ativo durante o período de armazenamento. Os NLC apresentam maior capacidade de encapsular moléculas em comparação aos SLN, devido sua estrutura cristalina imperfeita (Castro *et al.*, 2021b; Lammari *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2021).

Tabela 1 - Nanopartículas lipídicas e sistemas de entrega de moléculas (DDS) encapsulando diferentes OE e suas potenciais aplicações.

DDS	Composição	OE encapsulado	Método usado	Tamanho de partícula médio (nm)	Organismo-alvo	Resultado	Referência
SLN	Metanol, tween 80, Lecitina, colesterol	Canela	Homogeneização ultrassônica	337,6	<i>E. coli</i>	Potente efeito antimicrobiano e antibiofilme contra cepas de <i>E. coli</i> .	(Nemattalab <i>et al.</i> , 2022)
Filmes-NLC	Alginato, óleo de palma hidrogenado, tween 80	Timol	Método de difusão de solvente	96,5	<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	Filmes antimicrobianos com propriedades de liberação sustentada de timol.	(Karimi-Khorrami <i>et al.</i> , 2022)
Gel-NLC	Precirol, ácido esteárico, labrafac, tween 80	Canela	Homogeneização de alta pressão	108,48	<i>P. aeruginosa</i>	Atividade antimicrobiana significativa, promoção da cicatrização de feridas e regeneração da pele.	(Wen <i>et al.</i> , 2021)
Lipossomas	Lipoid S75	Citral puro	Hidratação filme lipídico e sonicação	101	<i>S. mutans</i>	Inibiu <i>S. mutans</i> , acelerou a cicatrização da mucosa oral. Possível uso como colutório.	(Palmas <i>et al.</i> , 2020)
SLN	Ácido esteárico, poloxamer 188	Cravo	Homogeneização de alto cisalhamento e ultrassom	397	<i>Salmonella typhi</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>Candida albicans</i>	Atividade antimicrobiana melhorada contra <i>S. Typhi</i> e <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i> .	(Fazly Bazzaz <i>et al.</i> , 2018)
Nanoemulsão	Monooleato de sorbitano, tween 80	Lemongrass	Homogeneização em alta potência	< 200	<i>C. albicans</i> , <i>Cryptococcus grubii</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i>	Potencialização da atividade antimicrobiana.	(Silva Gündel <i>et al.</i> , 2018)
NLC	Manteiga de cacau, azeite de oliva, lecitina	Eucalipto	Homogeneização de alto cisalhamento e ultrassom	250	<i>S. aureus</i> e <i>S. pyogenes</i>	Atividade antibacteriana aumentada contra <i>Streptococcus pyogenes</i> .	(Saporito <i>et al.</i> , 2017)

Figura 1 - Imagem ilustrativa de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN, acima) e de carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC, abaixo) encapsulando OE.



Fonte: Adaptado de Cimino *et al.*, 2021.

Acredita-se que os NLC apresentem maior possibilidade de serem empregados na entrega combinada de OE com fármacos convencionais, o que pode representar um avanço para a nanomedicina com abordagens adjuvantes para os OE (Cimino *et al.*, 2021). Esta pode ser uma estratégia terapêutica interessante, já que muitos pesquisadores estão se dedicando a desenvolver regimes terapêuticos antibacterianos que sejam “resistentes à resistência bacteriana”. Isso significa que esforços estão sendo realizados para minimizar o desenvolvimento de resistência e maximizar a destruição dos patógenos (Batchelder; Hare; Mok, 2023).

Vale ressaltar que, devido à sua natureza complexa composta por múltiplas moléculas bioativas, os OE têm uma atividade multialvo desejável, não observada nos antibióticos convencionais (Panda *et al.*, 2022). Além disso, esses compostos naturais pertencem à categoria geralmente reconhecida como segura (GRAS) para uso em humanos monitorada pela agência americana Food and Drug Administration (FDA), que inclui, por exemplo, OE de orégano, cravo, manjerição e canela (Jackson-Davis *et al.*, 2023). Dessa forma, o uso de OE como molécula bioativa e estrutural de NLC torna-se mais interessante principalmente devido ao baixo custo econômico, biocompatibilidade (Yu *et al.*, 2020), biodegradabilidade (Guidotti-Takeuchi *et al.*, 2022; Scioli Montoto; Muraca; Ruiz, 2020) e menor capacidade de estimular o desenvolvimento de resistência bacteriana (Lu *et al.*, 2018).

A via de administração mais comumente proposta para nanossistemas à base de lipídios é a via parenteral, seguida pela via oral e cutânea/transdérmica

(Scioli Montoto; Muraca; Ruiz, 2020). No entanto, para que nanoformulações sejam aprovadas para a fase clínica e posterior comercialização, é necessária uma caracterização rigorosa de alguns parâmetros como tamanho de partícula, distribuição de tamanho, polimorfismo e encapsulação de fármaco, todos críticos para a estabilidade da formulação final e garantia da qualidade, segurança e eficácia. Formulações de NLC com distribuição de tamanho de partícula constante e estreita são necessárias para alcançar resultados clínicos satisfatórios (Danaei *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2020b).

Além disso, desenvolver nanocarreadores com baixa ou nenhuma toxicidade para o organismo e o meio ambiente é um desafio. De acordo com o sistema de classificação nanotoxicológica sugerido por Keck e Muller (2013), as nanopartículas podem ser agrupadas conforme seu tamanho e biodegradabilidade: classe I (nenhum ou baixo risco) compreende nanossistemas com tamanho acima de 100 nm e feitos de materiais biodegradáveis; classe II (risco médio) compreende nanossistemas com tamanho acima de 100 nm compostos de materiais não-biodegradáveis; classe III (risco médio) compreende nanossistemas com tamanho inferior a 100 nm à base de materiais biodegradáveis, e classe IV (alto risco) compreende nanossistemas com tamanho inferior a 100 nm e não-biodegradável. No entanto, muitos outros fatores desempenham um papel determinante na nanotoxicidade de um sistema, incluindo a via de administração escolhida e a dose administrada (Scioli Montoto; Muraca; Ruiz, 2020), sendo necessário estudos rigorosos para garantir sua segurança e eficácia.

4 OPINIÃO CRÍTICA

De fato, a resistência antimicrobiana é um grave problema de saúde pública que ameaça gradativamente os humanos e outros animais, sendo urgente a busca por novas abordagens terapêuticas que sejam seguras, eficazes, escalonáveis e que possam ser usadas para tratamento, controle e prevenção de infecções causadas por bactérias multirresistentes.

Nesse sentido, os OE se apresentam como uma alternativa promissora a ser empregada na preparação de formulações antimicrobianas, considerando ainda seu baixo preço, sustentabilidade, grande diversidade e uso regulamentado pelo

FDA para aplicação em humanos. No entanto, esses compostos apresentam algumas características indesejáveis que limitam seu uso para fins biomédicos. Por outro lado, conforme sugerido por alguns pesquisadores, encapsulá-los em um sistema capaz de protegê-los da luz, oxidação e hidrólise, preservando sua bioatividade, pode ser uma estratégia muito interessante para garantir sua entrega ao alvo. Todavia, escolher o sistema ideal e o melhor método de preparação, em paralelo com a seleção adequada de OE, é um grande desafio que exige tempo e recursos financeiros até a obtenção de um produto final eficaz e seguro.

De acordo com o levantamento bibliográfico, percebe-se que inúmeras pesquisas validam o uso de NLC como potenciais nanosistemas de entrega de moléculas-ativas, sendo sua principal vantagem a possibilidade de usar excipientes naturais biocompatíveis, biodegradáveis e de baixo custo, como os OE e manteigas vegetais. Além disso, tais sistemas possuem métodos de preparo simples, escalonáveis, podem ser armazenados em temperatura ambiente e ainda permitem a liberação sustentada de ativos, proporcionando ação prolongada e comodidade ao usuário, reduzindo a frequência de administração de doses.

Acredita-se que o desenvolvimento de NLC naturais que encapsulem OE e apresentem atividade contra cepas bacterianas multirresistentes, sem a necessidade de encapsular um princípio ativo sintético, seja uma estratégia relevante na busca por novas alternativas terapêuticas eficazes, baratas e ecologicamente corretas. Contudo, são necessários mais estudos para confirmações *in vitro* e *in vivo*, seguidos de estudos pré-clínicos e clínicos que possam comprovar a segurança e a eficácia dessas nanoformulações para aplicações clínicas e sanitização de ambientes hospitalares, possibilitando sua produção em larga escala e disponibilidade para pacientes e serviços de saúde, principalmente da rede pública.

Com o emprego de ferramentas nanotecnológicas e bioinformática, espera-se que ocorra um avanço na pesquisa microbiológica, possibilitando em um futuro próximo, o desenvolvimento de uma formulação eficaz contra bactérias MDR e segura para aplicação terapêutica em humanos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aparecimento de bactérias resistentes aos tratamentos farmacológicos disponíveis representa uma ameaça global à saúde pública. Ao longo dos anos, as bactérias desenvolveram diferentes mecanismos de resistência aos antibióticos, permitindo-lhes colonizar e disseminar-se nos ambientes hospitalares, causando infecções relacionadas à assistência à saúde, tais como: infecções de corrente sanguínea, de cateter venoso central e associadas à ventilação mecânica. Essas infecções causadas por patógenos multirresistentes estão associadas a aumentos significativos nas taxas de morbidade e mortalidade, bem como ao aumento do tempo de internação do paciente e dos custos hospitalares, sendo os principais patógenos envolvidos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Uma das abordagens alternativas e bastante promissora é o uso de OE, uma vez que seus constituintes possuem naturalmente atividade antimicrobiana, antibiofilme e baixo potencial para estimular o desenvolvimento de resistência microbiana. No entanto, por apresentarem algumas características como solubilidade reduzida em água, alta volatilidade, sensibilidade à luz, toxicidade, odor e sabor intensos, a literatura aponta que encapsular os OE é uma estratégia relevante para estender sua estabilidade físico-química, protegendo-os da oxidação e da degradação ocasionada por fatores ambientais como luz e calor, garantindo sua entrega ao alvo, além de melhorar sua atividade biológica.

Alguns sistemas de entrega sustentada de moléculas ativas baseados em nanotecnologia, tais como as SLN e os NLC, têm atraído atenção dos pesquisadores nos últimos anos. Sua principal vantagem é possivelmente o uso de constituintes e métodos de preparação biocompatíveis e ecologicamente corretos. Além disso, conforme o sistema de classificação nanotoxicológica sugerido por Keck e Müller, os nanocarreadores desta categoria podem se enquadrar na classe de baixo risco dependendo do seu tamanho e do uso de excipientes biodegradáveis. No entanto, uma avaliação criteriosa sobre a segurança desses sistemas deve ser realizada antes de progredir para produção em escala industrial e comercialização.

**CAPÍTULO II: Nanopartículas lipídicas baseadas em
matrizes naturais com atividade contra cepas
multirresistentes isoladas de humanos**

RESUMO

A resistência bacteriana tornou-se motivo de preocupação para a saúde pública mundial devido ao aumento de espécies bacterianas multirresistentes, tais como: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Tais bactérias são responsáveis por causar infecções graves em pacientes hospitalizados, podendo evoluir para um quadro de infecção generalizada, sepse e óbito. Compostos bioativos de origem natural, como os óleos essenciais (OE), há anos são utilizados pela medicina popular em virtude de suas atividades biológicas intrínsecas e representam uma alternativa acessível para novos tratamentos. Seu encapsulamento em carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) pode trazer benefícios. O presente estudo objetivou o desenvolvimento de formulações de NLC compostas por OE e manteiga vegetal que apresentassem estabilidade físico-química, biocompatibilidade e potencial atividade contra cepas de *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* isoladas de humanos. Primeiramente, foi realizada uma triagem de 14 óleos naturais pelo teste de disco de difusão para selecionar os mais promissores quanto à atividade antibacteriana. Assim, foram selecionados quatro OE para serem nanoencapsulados como molécula-ativa e estrutural no preparo de diferentes formulações de NLC. Onze NLC foram desenvolvidos e avaliados quanto à estabilidade físico-química (tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial Zeta) durante 1 ano (25 °C). Ensaio antimicrobiano *in vitro* foi realizado para determinação da concentração inibitória mínima de cada NLC contra as cepas estudadas. O sistema mais promissor foi composto por OE de canela (NLC/CAN). Suas propriedades estruturais foram avaliadas com metodologias experimentais (espectroscopia da região do infravermelho por transformada de Fourier, calorimetria diferencial exploratória e microscopia eletrônica de varredura). Por fim, o estudo de nanotoxicidade *in vivo* em modelo biológico alternativo de embrião de galinha determinou que NLC/CAN não induziu nanotoxicidade em nenhum dos parâmetros avaliados.

Palavras-chave: bactérias multirresistentes; carreadores lipídicos nanoestruturados; lipídios naturais.

ABSTRACT

Bacterial resistance has become a public health concern worldwide, due to the increase in multidrug-resistant bacterial species, such as: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Such bacteria are responsible for causing serious infections in hospitalized patients, which can progress to a generalized infection, sepsis and death. Bioactive compounds of natural origin, such as essential oils (EO), have been used by popular medicine for years, due to their intrinsic biological activities, representing a promising alternative for new treatments. Its encapsulation in nanostructured lipid carriers (NLC) can bring several benefits. The present study aimed to develop NLC formulations composed of EO and vegetable butter that present physicochemical stability, biocompatibility and *in vitro* activity against strains of *A. baumannii*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* isolated from humans. First, a screening of 14 natural oils was carried out by the disk diffusion test to select the most promising samples in terms of antibacterial activity. Thus, 4 EO were selected to be nanoencapsulated as active and structural compounds in the preparation of different NLC formulations. Then, 11 NLC were prepared and evaluated for physicochemical stability (particle size, polydispersion index and Zeta potential) for 1 year (25 °C). *In vitro* antimicrobial assay was performed to determine the minimum inhibitory concentration of each NLC against the tested strains. The most promising system was composed of cinnamon EO (NLC/CAN), and its structural properties were evaluated using experimental methodologies (Fourier transform infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry and scanning electron microscopy). Finally, the *in vivo* nanotoxicity study was carried out through the alternative biological model of chicken embryo, which determined that NLC/CAN did not induce nanotoxicity in any of evaluated parameters.

Keywords: multi-resistant bacteria; nanostructured lipid carriers; natural lipids.

1 INTRODUÇÃO

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista contendo as principais bactérias resistentes aos antibióticos que necessitam prioridade global no desenvolvimento de pesquisas objetivando a descoberta de novos medicamentos. Esta lista é composta por um catálogo de 12 famílias de bactérias que representam uma grande ameaça à saúde humana e é dividida em 3 categorias de acordo com a urgência da necessidade de novos antibióticos: prioridade crítica, alta e média. O grupo mais crítico de todos inclui as bactérias multirresistentes aos fármacos, ou seja, representam uma ameaça particular em hospitais, casas de repouso e entre os pacientes cujo cuidado requer dispositivos como ventiladores e cateteres de corrente sanguínea. Tais espécies incluem *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e várias enterobactérias (incluindo *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* e *Proteus*), capazes de causar infecções graves com alto índice de mortalidade, como infecções de corrente sanguínea e pneumonia. Essas bactérias tornaram-se resistentes a um grande número de antibióticos, incluindo carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração (Tacconelli *et al.*, 2018).

A maior preocupação está justamente relacionada ao surgimento de isolados bacterianos resistentes aos carbapenêmicos, uma vez que as opções farmacológicas se tornam limitadas e a probabilidade de sucesso terapêutico reduzida (World Health Organization, 2021). Essa situação tende a se agravar gradativamente, pois o surgimento de bactérias resistentes supera a introdução de novas opções terapêuticas capazes de combatê-las (Batchelder; Hare; Mok, 2023).

Em 2019, as estimativas indicaram que 4,95 milhões de mortes foram associadas a bactérias resistentes a antibióticos, sendo *E. coli* responsável pela maioria dessas mortes, seguida por *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *A. baumannii*, *S. pneumoniae* e *M. tuberculosis* (Murray *et al.*, 2022). Conforme o relatório de O'Neill (2016) intitulado "*Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations*", estima-se que até 2050 o ônus das mortes por microrganismos resistentes a antibióticos poderá ser de 10 milhões de vidas a cada ano, caso não sejam tomadas medidas urgentes.

As espécies de *Acinetobacter* são importantes patógenos Gram-negativos relacionados a infecções hospitalares graves, podendo causar meningite, infecção

de corrente sanguínea e pneumonia associada à ventilação em pacientes de Unidades de Tratamento Intensivo (Pormohammad *et al.*, 2020). O interesse sobre *A. baumannii* deve-se, principalmente, à sua capacidade de adquirir resistência a antibióticos e formar biofilmes sob materiais e superfícies (Colquhoun; Rather, 2020). Isolados de *A. baumannii* têm alta capacidade de disseminação e elevado potencial de causar surtos devido à sua habilidade de sobreviver durante meses sob superfícies como cerâmica, plástico, aço inoxidável e borracha. Dessa forma, muitos surtos têm sido relacionados à disseminação ambiental associada à transmissão por equipamentos médicos contaminados e pelas mãos dos profissionais de saúde (ANVISA, 2021).

Por outro lado, *Klebsiella pneumoniae* é o patógeno mais frequente que causa pneumonias entre as bactérias Gram-negativas e atinge comumente pessoas debilitadas e malnutridas (Kumar *et al.*, 2016), também capaz de formar biofilme. O biofilme de *K. pneumoniae* clinicamente aparente é formado no cateter e na superfície interna dos dispositivos invasivos, podendo levar à colonização nos tratos respiratório, gastrointestinal e urinário, bem como desenvolver infecções invasivas, como pneumonia e abscesso hepático, especialmente em pacientes imunocomprometidos. O surgimento e disseminação de cepas multirresistentes (MDR) é um problema de saúde pública urgente a ser resolvido (Wang *et al.*, 2020).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa capaz de sobreviver em muitos ambientes, sendo reconhecida como um patógeno oportunista associado a infecções hospitalares e pneumonia associada à ventilação mecânica. Causa alta morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística (FC) e indivíduos imunocomprometidos (Pang *et al.*, 2019). Tende a invadir os vasos sanguíneos com consequente disseminação extrapulmonar. A septicemia por *P. aeruginosa* é uma doença extremamente fulminante (Kumar *et al.*, 2016).

A nanotecnologia é um campo promissor a ser empregado no desenvolvimento de sistemas de liberação de moléculas-ativas (DDS). O objetivo desta linha de conhecimento é aumentar a biodisponibilidade, reduzir a toxicidade e melhorar a eficácia de moléculas-ativas encapsuladas, adsorvidas ou intercaladas por nanocarreadores. (Ribeiro *et al.*, 2016). A segunda geração de nanopartículas lipídicas, conhecidas como carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC), consiste em uma mistura de dois ou mais lipídios sólidos e líquidos à

temperatura ambiente, estabilizados por pelo menos um surfactante (Castro *et al.*, 2021b). Nos últimos anos, tem sido empregado com êxito na liberação sustentada de moléculas hidrofóbicas, exibindo excelentes propriedades estruturais, tempo de prateleira mínimo de 1 ano (25 °C), perfil de liberação sustentado, biocompatibilidade e eficácia comprovada em modelos alternativos de animais e mamíferos (Ribeiro *et al.*, 2017, 2021).

Os óleos essenciais (OE) têm sido amplamente encapsulados por NLC atuando como promissores antimicrobianos, anti-inflamatórios, antineoplásicos e analgésicos (Geronimo *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2020b, 2021).

O OE de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), por exemplo, tem demonstrado atividade antimicrobiana promissora contra algumas bactérias de interesse clínico. Pesquisas mostraram que o OE obtido da casca de *C. zeylanicum* é rico em compostos bioativos, sendo seu principal constituinte químico o cinamaldeído. Apresenta excelente atividade antioxidante e efeito antibacteriano (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2020).

Já o OE de orégano (*Origanum vulgare*) é bastante conhecido devido seu sabor agradável e o amplo espectro de atividades biológicas: antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, antiparasitária, anti-inflamatória, antitumoral e anti-hiperglicêmica. Tais propriedades estão relacionadas principalmente com a presença dos compostos ativos carvacrol e timol. Estudos demonstraram que o OE de orégano representa uma alternativa eficaz como agente antimicrobiano contra cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo as multirresistentes *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (Lombrea *et al.*, 2020). Ensaio antibacterianos mostraram sua atividade contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, onde a maior suscetibilidade foi encontrada frente à *S. aureus* (Plati; Papi; Paraskevopoulou, 2021).

Outro OE que vem se destacando é extraído de *Melaleuca alternifolia*, apresentando atividade antimicrobiana significativa contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. italicum* Wehmer e *P. digitatum* Sacc. As bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis ao OE que as Gram-negativas e fungos (Zhang *et al.*, 2018). A literatura relata que o composto majoritário do OE de melaleuca é o terpinen-4-ol. No entanto, é possível sugerir que sua atividade antimicrobiana resulte de uma

interação complexa e sinérgica entre os seus diferentes componentes (Brun *et al.*, 2019).

Desta forma, o presente trabalho objetivou desenvolver formulações de NLC compostas por manteigas naturais encapsulando diferentes OE com atividade antimicrobiana contra cepas de *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de humanos.

2 MATERIAIS

A manteiga de ucuúba e os óleos naturais utilizados, a saber: OE de canela casca (*Cinnamomum zeylanicum*), OE de orégano (*Origanum vulgare*), OE de melaleuca (*Melaleuca artemisia*), OE de hortelã-pimenta (*Mentha Piperita*), OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), OE de cravo (*Eugenia caryophyllus*), OE de gengibre (*Zingiber officinale*), OE de sálvia (*Salvia sclarea*), OE de basilicão (*Ocimum basilicum*), OE de citronela (*Cymbopogon nardus*), OE de anis-estrelado (*Illicium verum*), OE de olíbano (*Boswellia carteri*), candeia (*Eremanthus erythropappus*) e copaíba (*Copaifera officinalis*) foram obtidos comercialmente da empresa Engetec/Engenharia das Essências®. Poloxamer (Kolliphor® P188) foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich, USA. A água deionizada (18 MΩ) foi obtida de um purificador de água ultrapura Milli-Q® Direct 8.

Os isolados bacterianos de *A.baumannii* (65JF, OXA-23 e POA4-28), *K. pneumoniae* (ATCC700603, Sensível e Bactray) e *P. aeruginosa* (IMP-1 e PAO-1) foram obtidos da coleção do laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde: *K. pneumoniae* ATCC700603 é uma amostra padrão, *K. pneumoniae* Sensível foi isolada de paciente do Hospital de Clínicas-UFU; as demais cepas foram isoladas de pacientes atendidos em outros hospitais.

Os meios de cultura utilizados foram: ágar Triptona de Soja (Isofar, Brasil), Ágar MacConkey (Ion, India), Ágar Mueller Hinton (Laboratórios Conda S.A., Espanha) e Caldo Mueller Hinton (Biolog®). Além disso, foram utilizados discos impregnados de antibiótico Polimixina B (Cefar Diagnóstica Ltda, São Paulo, Brasil).

3 METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido sob orientação da Prof.^a Dra. Lígia Nunes de Moraes Ribeiro e coorientação da Dra. Luciana Machado Bastos, no Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho do Instituto de Biotecnologia, no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas e no Laboratório de Incubação de aves (coordenados pela Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca) da Faculdade de Medicina Veterinária, pertencentes à Universidade Federal de Uberlândia. As cepas bacterianas analisadas foram cedidas pelo laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia em colaboração com a Prof.^a Dra. Rosineide Marques Ribas.

3.1 *Screening* dos óleos naturais

Foi realizada uma triagem com 12 OE (alecrim, hortelã-pimenta, canela, cravo, gengibre, orégano, melaleuca, sálvia, basilicão, citronela, anis-estrelado, olíbano) e 2 óleos vegetais (candeia e copaíba) através do teste de susceptibilidade antimicrobiana por disco de difusão. Foi utilizado como controle positivo discos comerciais impregnados com Polimixina B, com o intuito de selecionar os óleos mais promissores para serem encapsulados em formulações de NLC, com base nos maiores halos de inibição (mm) obtidos.

As cepas de interesse foram inoculadas em meio de cultura ágar Triptona de Soja (TSA) ou ágar MacConkey e incubadas a 37 °C por 24 h. Após esse período, 3 a 5 colônias isoladas do mesmo tipo morfológico (espécie) foram colhidas e dispersas em 10 mL de solução salina estéril 0,9 % até uma concentração final de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) mL⁻¹ (Ribeiro *et al.*, 2021). Os inóculos bacterianos resultantes foram empregados no teste de disco de difusão em ágar. Placas contendo ágar Mueller Hinton foram preparadas antecipadamente e avaliadas quanto à esterilidade. Com um *swab* estéril, um inóculo de cada bactéria testada (*A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*) com turbidez de 0,5 na escala de *MacFarland* foi espalhado uniformemente sobre a superfície do ágar e as placas foram deixadas em repouso a temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos. Em seguida, discos impregnados com Polimixina B

(controle positivo) e o respectivo OE foram depositados nas placas previamente identificadas, em duplicata e incubadas em estufa a 37 ± 1 °C por 24 h (Ribeiro *et al.*, 2020a). Por fim, os halos de inibição do crescimento (mm) foram medidos utilizando régua milimetrada. Os testes estatísticos One way ANOVA/Tukey *post hoc* foram empregados para avaliar diferenças estatísticas intergrupo ($p < 0,05$), através dos *softwares* Microsoft Excel Professional Plus 2019 e Action versão 2.9.

3.2 Preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC)

O método da emulsificação-ultrasonicação à quente foi utilizado para o preparo das diferentes formulações de NLC. A fase lipídica das NLC foi composta por manteiga de ucuúba (lipídio sólido) e OE (lipídio líquido), com concentração de lipídios totais de 10 % (m/v) em uma proporção de lipídios líquidos para lipídios totais de 0,1:1. Em banho-maria, a fase lipídica foi aquecida 10 °C acima da temperatura de fusão do lipídio sólido (manteiga de ucuúba, ponto de fusão = 45,3 °C). Concomitantemente, a fase aquosa composta por uma solução de poloxamer 5 %, foi aquecida na mesma temperatura da fase lipídica. Em seguida, a fase aquosa foi adicionada gota-a-gota à fase lipídica, sob agitação de 10.000 rpm por 2 min, em homogeneizador de alta pressão Ultra-Turrax (Ultra-turrax® T18) para a formação da microemulsão. A microemulsão formada foi imediatamente submetida à ultrasonicação por 20 minutos em um sonicador de ponta Vibracell (Sonics & Mat. Inc., Danbury, EUA) operado a 500 W e 20 kHz, com ciclos de 30 segundos ligado e 30 segundos desligado. Após finalizada esta etapa, a nanoemulsão formada foi arrefecida em banho de gelo até alcançar 25 °C, a fim de solidificar as nanopartículas (Ribeiro *et al.*, 2021).

3.3 Estudo da estabilidade físico-química

As medidas de tamanho de partícula (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta (mV) foram realizadas pela diluição das formulações (1:1000 v/v) em água deionizada. Foi utilizado o equipamento de espalhamento dinâmico de luz Litesizer (Anton Paar Instruments, Anton Paar, Berlim, Alemanha). Os mesmos

parâmetros foram acompanhados durante 12 meses em armazenagem em temperatura ambiente, em triplicata (Ribeiro *et al.*, 2017).

Os testes estatísticos One way ANOVA/Tukey *post hoc* foram empregados para avaliar diferenças estatísticas intragrupo ao longo do tempo ($p < 0,05$), calculados pelo *software* GraphPad Prism 8.

3.4 Caracterização estrutural das formulações de NLC

A técnica de transformada de Fourier foi utilizada para registrar os espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR-ATR). Os registros foram realizados na região compreendida entre 4.000 e 650 cm^{-1} . Essa técnica permite o estudo das possíveis interações entre os excipientes utilizados nas formulações, revelando informações importantes acerca da nova estrutura preparada.

Foram realizados testes de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) utilizando um equipamento marca TA, modelo Q20. As amostras foram analisadas por Calorímetro Diferencial de Varredura, em um porta-amostra padrão de alumínio selado. As análises foram feitas em atmosfera de nitrogênio, a um fluxo de 50 mL min^{-1} , na faixa de temperatura de 0 a 100 $^{\circ}\text{C}$, com rampa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C/min}$. As curvas de análise térmica são úteis para demonstrar mudanças termodinâmicas das formulações em relação aos excipientes empregados.

Para a elucidação da morfologia das NLC, foi realizada análise de microscopia utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), marca Tescan, modelo VEGA 3 LMU. Para o preparo das amostras, uma gota de cada amostra foi aderida a uma lamínula de vidro previamente fixada a um porta-amostra de alumínio (stub). Após a completa evaporação do solvente, os stubs foram submetidos ao processo de *sputtering* durante 120 s a 30 kV e armazenados em dissecador até a análise. As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura com detectores de elétrons secundários e retroespalhados, operando em alto vácuo sob tensão de 20 kV.

3.5 Teste da Concentração Inibitória Mínima

Para realização do teste, foram utilizadas 3 cepas de *Acinetobacter baumannii*, 2 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e 3 cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de humanos. Os inóculos bacterianos foram preparados conforme detalhado anteriormente na etapa de *screening* dos OE.

Os NLC preparados foram avaliados quanto sua atividade antimicrobiana, através do teste de microdiluição para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Este experimento foi realizado em placas de 96 poços e em triplicata. A suspensão bacteriana preparada anteriormente foi adicionada em cada poço da placa a uma concentração final de 1×10^6 UFC·mL⁻¹. Em seguida, diluições contendo diferentes concentrações das formulações foram adicionadas em poços previamente definidos até um volume final de 0,1mL. Utilizou-se como controle negativo caldo Mueller Hinton sem bactérias. A placa de 96 poços foi incubada a 37 °C por 24 h. A CIM de cada formulação de NLC foi determinada com base na menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano das cepas de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Os testes estatísticos One way ANOVA/Tukey *post hoc* foram os métodos adotados para avaliar diferenças estatísticas intergrupo ($p < 0,05$), determinados pelos *softwares* Microsoft Excel Professional Plus 2019 e Action versão 2.9.

3.6 Ensaio de nanotoxicidade *in vivo* em modelo de embrião de galinha

A nanotoxicidade das formulações de NLC e seus respectivos OE emulsificados foi avaliada em modelo *in vivo* de embrião de galinha de acordo com os seguintes parâmetros: viabilidade (%), alteração do peso do embrião (g) e dos anexos (gema, membrana córion alantoide e âmnio).

No ensaio, diferentes soluções controle foram adotadas para comparação dos resultados, a saber: Solução salina 0,85 % como controle negativo (CN); Emulsão de OE composta por OE e Poloxamer nas concentrações de 10 % (m/v) e 5 % (m/v), respectivamente; e Formulação de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (SLN) composta de lipídio sólido na proporção de 10 % (m/v) e surfactante 5 %

preparada pelo método da emulsificação-ultrasonicação à quente. Para fins didáticos, esta formulação foi denominada de NLC controle.

Foram utilizados 80 ovos de *Gallus gallus*, linhagem W-36. Antes das análises, os ovos foram submetidos à ovoscopia para garantir a viabilidade dos embriões com 7 dias de desenvolvimento. Os ovos foram pesados e divididos em 10 grupos (n = 8): controle negativo (CN), onde os ovos foram tratados com solução salina; NLC controle (sem adição de OE); emulsão de OE de canela; NLC contendo OE de canela. Todos os tratamentos foram testados nas seguintes concentrações de lipídios: 5, 3 e 1 % (m/v).

Os ovos foram então incubados por 7 dias. A mortalidade dos embriões foi analisada diariamente para determinar a viabilidade (%). Aos 14 dias de desenvolvimento embrionário, os ovos foram pesados utilizando uma balança de precisão Bel Engineering®, Modelo MW503, Resolução 0,001g para análise da alteração de peso. Em seguida, o embrião e seus anexos foram pesados.

A alteração de peso do embrião e anexos foi calculada através da diferença entre o peso dos ovos antes e depois dos tratamentos de acordo com a seguinte equação:

$$aW = (ce.ysW \times 50) \div ieW \quad \text{(Equação 1)}$$

onde: aW: peso do ovo ajustado para 50 g; ce.ysW: peso do embrião ou anexo; ieW: peso inicial do ovo.

Os testes estatísticos ANOVA/Tukey *post hoc* foram empregados para avaliar diferenças estatísticas intergrupo com relação ao peso de embrião e anexos considerando um $p < 0,05$. Para o teste de viabilidade embrionária foi usado o teste do qui-quadrado seguido do teste da diferença entre duas proporções considerando o controle negativo e todos os outros grupos o $p < 0,05$. Foi utilizado o *software* GraphPad Prism 8 para as análises.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado obtido na triagem dos óleos naturais quanto à suscetibilidade antimicrobiana identificou aqueles cujas cepas estudadas foram resistentes ou sensíveis. Na Tabela 1 são apresentados os OE que demonstraram possuir

capacidade de inibir o crescimento bacteriano com os respectivos halos de inibição em comparação com o controle positivo (polimixina B).

Para a espécie de *A. baumannii*, os halos obtidos com OE de canela e orégano foram estatisticamente significativos e superiores à polimixina B, que apresentou halo médio de 13,5 mm ($p < 0,05$) em 100 % das cepas bacterianas testadas. O OE de canela exibiu valor médio de 33,0 mm e o OE de orégano 28,2 mm. O tratamento com OE de hortelã-pimenta, basilicão, melaleuca e cravo que em cepa POA4-28 resultou em halos de inibição médio de 25,0, 24,0, 20,0 e 19,0 mm, respectivamente (Tabela 1 e Figuras 1 a 3). Outros estudos também apontaram propriedades antibacterianas significativas para OE de canela, que inibiu o crescimento de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (El-Kattan; Allam, 2021; Ganić *et al.*, 2022) apresentando halos de inibição acima de 22 mm de diâmetro frente a *A. baumannii*, especificamente (Kaskatepe *et al.*, 2016).

Em relação às cepas de *K. pneumoniae*, observamos que somente 3 OE (canela, orégano e hortelã-pimenta) demonstraram atividade estatisticamente significativa e superior à polimixina B ($p < 0,05$), que apresentou halo médio de 14,5 mm. Todas as cepas analisadas dessa bactéria tiveram crescimento inibido por OE de canela e orégano, com halos de inibição médio variando entre 30,5 a 40,0 mm para o OE de canela e de 20,5 a 39,5 mm para o OE de orégano. Por outro lado, em cepas BacTray somente o tratamento com OE de hortelã-pimenta, que obteve halo médio de 26,0 mm, demonstrou atividade estatisticamente significativa e superior à polimixina B ($p < 0,05$), com halo médio de 13,5 mm (Tabela 1 e Figuras 6 a 8). Outros estudos relataram atividade antibacteriana satisfatória do OE de canela e *in vitro* verificou-se que este OE exibiu maior atividade antibiofilme contra *K. pneumoniae*, seguido do OE de hortelã-pimenta (Sarwar; Ali; Ahmed, 2022). Man *et al.* (2019) conduziram um estudo na Itália para investigar a atividade antibacteriana de 6 OE (tomilho, olíbano, murta, limão, orégano e lavanda) contra algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cepas de *K. pneumoniae*, e constataram que o OE de orégano é um dos mais promissores bactericidas frente às bactérias estudadas, conseguindo efeito significativo em concentrações baixas.

Por fim, os diferentes tratamentos com OE de canela, hortelã-pimenta, orégano e citronela contra *P. aeruginosa* demonstraram atividade estatisticamente

significativa e superior à polimixina B com halo médio de 14,5 mm ($p < 0,05$) (Tabela 1 e Figuras 4 e 5). As duas cepas analisadas, PAO-1 e IMP-1, tiveram seu crescimento inibido por OE de canela apresentando halo de inibição de 21,0 e 34,5 mm, respectivamente. Somente a cepa IMP-1 teve seu crescimento inibido pelos tratamentos à base de OE de hortelã-pimenta, orégano e citronela, que obtiveram halos de inibição de 33,0, 30,0 e 18,5 mm, respectivamente. Resultado semelhante foi descrito em um estudo realizado na Romênia, que teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de 16 OE contra isolados clínicos de *P. aeruginosa* MDR, constatando que o OE de canela inibiu o crescimento de 100 % das cepas bacterianas analisadas, apresentando halos de inibição com diâmetro médio igual 24,72 mm (Coseriu *et al.*, 2023).

A partir dos resultados obtidos nesta triagem dos OE, foi observado que os OE de canela (casca) e orégano eram capazes de inibir todas as cepas das espécies bacterianas testadas, demonstrando uma possível atividade de amplo espectro. O OE de canela exibiu halo de inibição variando de 21,0 a 37,50 mm enquanto o OE de orégano foi responsável por halos que variaram de 9,50 a 39,50 mm. Já polimixina B exibiu halo médio de 14,1 mm, considerando todas as cepas das espécies bacterianas avaliadas.

A identificação de compostos bioativos que representem uma alternativa eficaz aos antibióticos é um passo importante da ciência na tentativa de minimizar a iminente resistência bacteriana (Kaskatepe *et al.*, 2016). No presente trabalho, os resultados demonstraram que houve semelhança no comportamento do OE de canela e orégano frente as cepas de *A. baumannii* e *K. pneumoniae*. No entanto, os maiores halos de inibição foram exibidos pelo OE de canela. Em relação à *P. aeruginosa*, o desempenho do OE de orégano foi cepa-dependente, uma vez que um isolado bacteriano demonstrou resistência. Um estudo desenvolvido na Romênia encontrou resultado semelhante e relatou que isolados clínicos de *P. aeruginosa* com fenótipo de resistência semelhante e testados nas mesmas condições apresentaram respostas diferentes ao mesmo OE (Coseriu *et al.*, 2023), o que poderia explicar o motivo pelo qual o tratamento desse tipo de infecção é tão difícil.

Nesse teste preliminar, o OE mais promissor foi de canela. O ensaio também mostrou que OE de hortelã-pimenta e OE de melaleuca eram capazes de inibir o

crescimento bacteriano, produzindo halos de inibição variando de 10,0 a 33,0 mm e 10,5 a 20,0 mm, respectivamente.

Com bases nos resultados obtidos *in vitro* através do teste de disco-difusão em ágar (Tabela 1 e Figuras 1 a 8), foram selecionados 4 OE para serem nanoencapsulados como moléculas-ativas e estruturais dos NLC, sendo eles: OE de canela, OE de hortelã-pimenta, OE de melaleuca e OE de orégano.

Tabela 1 - Halo de inibição de crescimento de diferentes espécies bacterianas tratadas com distintos OE puros.

TRATAMENTO (OE)	HALO MÉDIO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO BACTERIANO (mm)							
	<i>A. baumannii</i> 65JF	<i>A. baumannii</i> OXA-23	<i>A. baumannii</i> POA4-28	<i>K. pneumoniae</i> ATCC700603	<i>K. pneumoniae</i> bactray	<i>K. pneumoniae</i> sensível	<i>P. aeruginosa</i> IMP-1	<i>P. aeruginosa</i> PAO-1
Alecrim	0,00±0,00	0,00±0,00	9,00±1,41	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,00±0,00
Anis-estrelado	9,50±0,70	0,00±0,00	14,00±0,00***	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Basilicão	14,50±2,12***	12,50±0,70***	24,00±1,41*	4,50±0,70	13,50±0,70***	9,00±0,00***	11,00±1,41**	0,00±0,00
Canela	30,00±0,00*	37,50±3,53*	31,50±0,70*	30,50±0,70*	40,00±1,41*	31,00±1,41*	34,50±6,36*	21,00±1,41*
Citronela	10,00±0,00	0,00±0,00	13,00±1,41***	0,00±0,00	18,00±2,82***	0,00±0,00	18,50±2,12 **	0,00±0,00
Cravo	12,50±2,12***	11,50±0,70***	19,00±1,41**	9,50±0,70	14,00±1,41***	15,00±0,00**	15,00±0,00**	0,00±0,00
Hortelã-pimenta	13,50±0,70***	0,00±0,00	25,00±7,07*	0,00±0,00	26,00±1,41**	10,00±1,41***	33,00±4,24*	0,00±0,00
Melaleuca	15,00±0,00***	14,00±2,82***	20,00±11,31**	10,50±0,70	13,00±1,41	13,00±0,00**	16,00±0,00**	0,00±0,00
Orégano	22,50±0,70**	26,50±4,94**	35,50±6,36*	20,50±0,70**	39,50±0,70*	30,00±0,00*	30,00±0,00*	9,50±0,70**
Sálvia	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	17,00±1,41***	0,00±0,00	9,50±0,70***	6,00±1,41***
Polimixina B	15,00±0,00***	12,50±2,12***	13,00±0,00***	15,00±0,00***	13,50±2,12***	15,00±0,00**	14,00±0,00**	15,00±0,00*

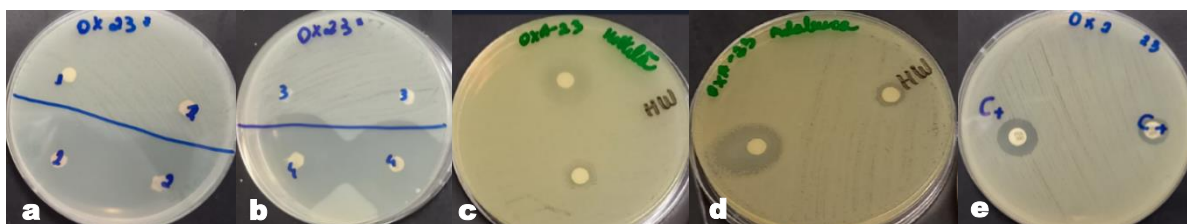
Médias na mesma coluna seguidas de asteriscos distintos diferem estatisticamente entre si $p < 0,05$ (One-way ANOVA, seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey);

* representa os maiores valores de médias semelhantes entre si;

** representa os segundos maiores valores de médias semelhantes entre si;

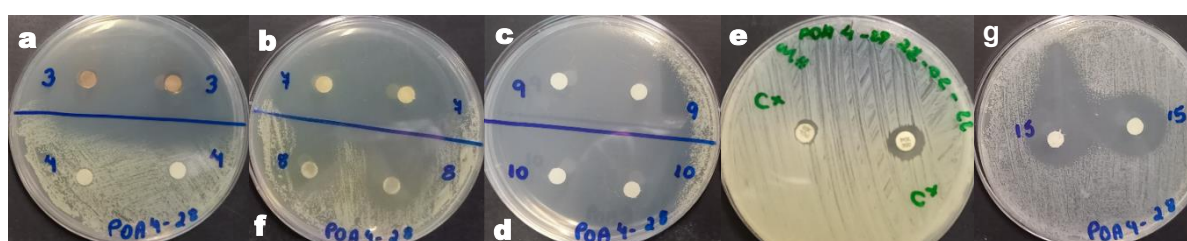
*** representa os terceiros maiores valores de médias semelhantes entre si.

Figura 1 - Halos de inibição da cepa *A. baumannii* OXA-23 sob tratamento com diferentes OE.



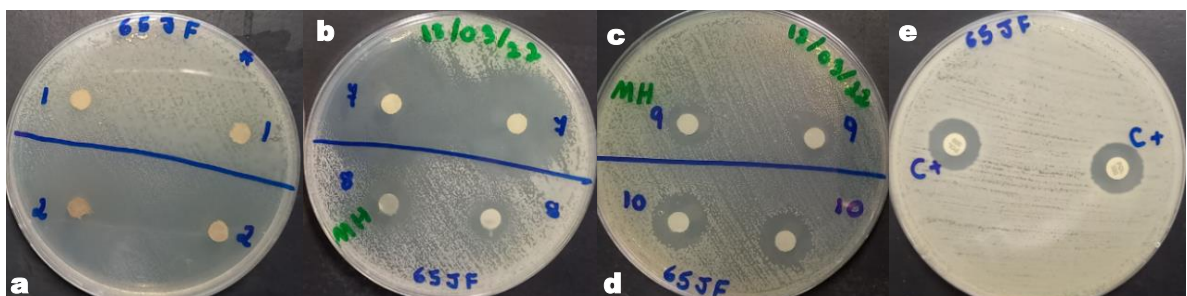
OE de orégano (a), OE de canela (b), OE de hortelã-pimenta (c), OE de melaleuca (d) e Polimixina B (e).

Figura 2 - Halos de inibição da cepa *A. baumannii* POA4-28 sob tratamento com diferentes OE.



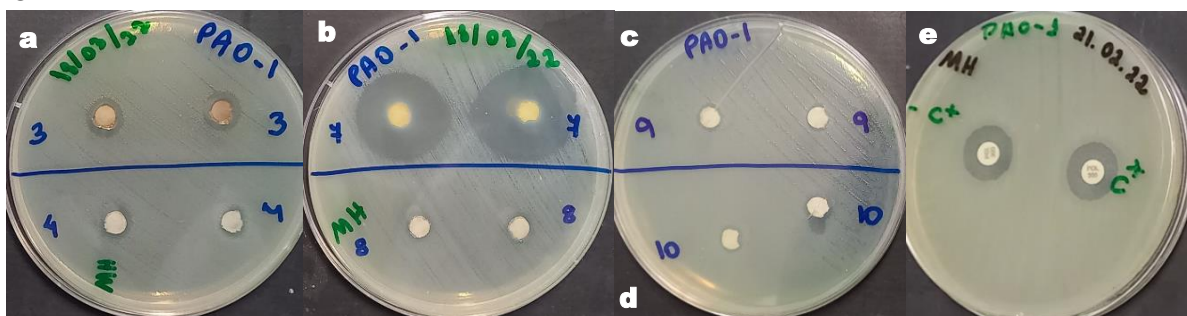
OE de orégano (a), OE de canela (b), OE de hortelã-pimenta (c), OE de melaleuca (d), Polimixina B (e), OE de Cravo (f) e OE de basilicão (g).

Figura 3 - Halos de inibição da cepa *A. baumannii* 65JF sob tratamento com diferentes OE.



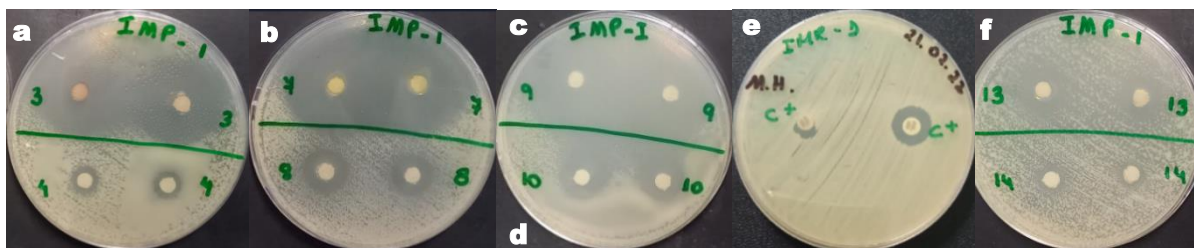
OE de orégano (a), OE de canela (b), OE de hortelã-pimenta (c), OE de melaleuca (d) e Polimixina B (e).

Figura 4 - Halos de inibição da cepa *P. aeruginosa* PAO-1 sob tratamento com diferentes OE.



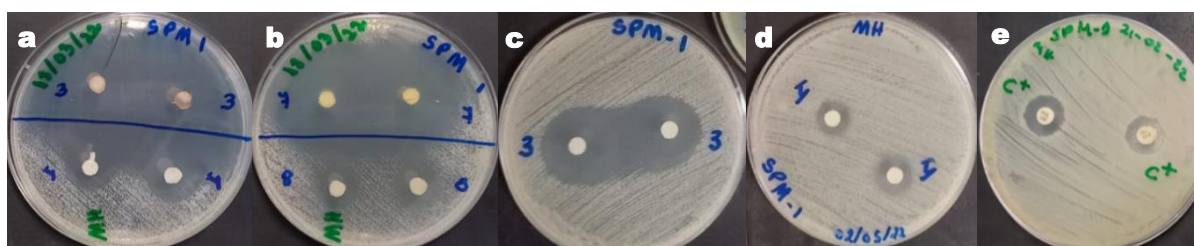
OE de orégano (a), OE de canela (b), OE de hortelã-pimenta (c), OE de melaleuca (d) e Polimixina B (e).

Figura 5 - Halos de inibição da cepa *P. aeruginosa* IMP-1 sob tratamento com diferentes OE.



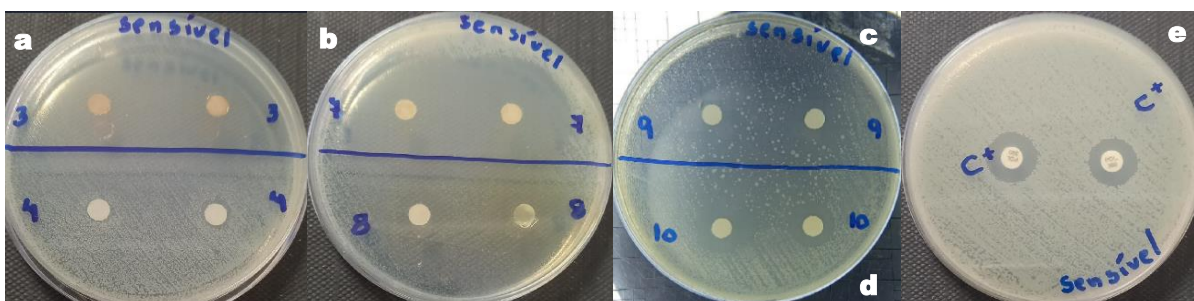
OE de orégano (a), OE de canela (b), OE de hortelã-pimenta (c), OE de melaleuca (d), Polimixina B (e) OE de Citronela (f).

Figura 6 - Halos de inibição da cepa *K. pneumoniae* Bactray sob tratamento com diferentes OE.



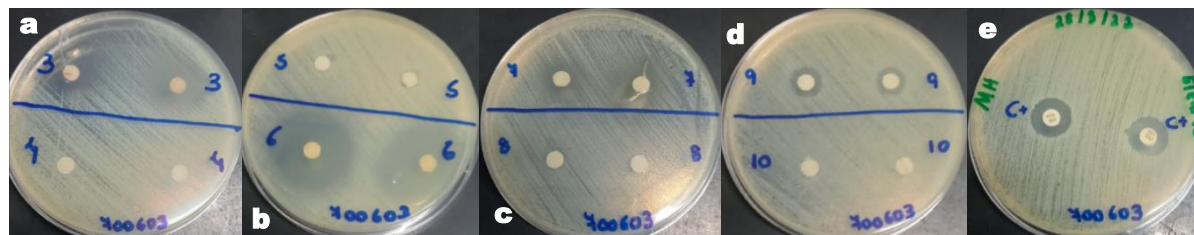
OE de orégano (a), OE de canela (b), OE de hortelã-pimenta (c), OE de melaleuca (d) e Polimixina B (e).

Figura 7 - Halos de inibição da cepa *K. pneumoniae* Sensível sob tratamento com diferentes OE.



OE de orégano (a), OE de canela (b), OE de hortelã-pimenta (c), OE de melaleuca (d) e Polimixina B (e).

Figura 8 - Halos de inibição da cepa *K. pneumoniae* ATCC700603 sob tratamento com diferentes OE.



OE de orégano (a), OE de canela (b), OE de hortelã-pimenta (c), OE de melaleuca (d) e Polimixina B (e).

Após a seleção dos principais OE e buscando avaliar um possível efeito sinérgico entre os compostos bioativos, foram preparadas formulações de NLC com diferentes composições e concentrações lipídicas, resultando em um total de 10 nanoformulações. Uma formulação com a mesma composição lipídica sólida, mas sem OE, foi preparada como controle (Tabela 2). A escolha da manteiga de ucuúba como lipídio sólido foi fundamentada em sua capacidade de encapsular moléculas hidrofóbicas, além de possuir um ponto de fusão superior à temperatura fisiológica conforme dados publicados anteriormente (Castro *et al.*, 2021b; Ribeiro *et al.*, 2021).

As formulações resultantes foram armazenadas individualmente em tubos Falcon à temperatura ambiente (25 °C) e apresentaram aspecto leitoso, homogêneo e fluido à inspeção visual, aspecto que se manteve durante todo tempo de acompanhamento.

Tabela 2 - Composição e concentração do total de lipídios (TL), manteiga de ucuúba (LS), óleos essenciais (OE) e surfactante empregados em cada uma das formulações de NLC.

NLC	TL (%)	LS (%)	OE (%)
F1	10	90	Canela, 10 %
F2	10	90	Orégano, 10 %
F3	10	90	Hortelã-pimenta, 10 %
F4	10	90	Melaleuca, 10 %
F5	10	90	-
F6	10	90	Canela e Orégano, 10 %
F7	10	90	Canela e Hortelã-pimenta, 10 %
F8	10	90	Canela e Melaleuca, 10 %
F9	10	90	Orégano e Hortelã-pimenta, 10 %
F10	10	90	Orégano e Melaleuca, 10 %
F11	10	90	Melaleuca e Hortelã-pimenta, 10 %

TL= LS+OE; Todos NLC foram estabilizados com poloxamer 5 % (m/v).

O estudo da estabilidade físico-química de sistemas particulados é fundamental para garantir o controle de qualidade das formulações. Por meio dele é determinado o prazo de validade do produto, sendo preconizado por diferentes farmacopeias e exigido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária via Resolução - RDC Nº 318, de 6 de novembro de 2019 (ANVISA, 2019). Sendo assim, logo após o preparo e em tempos pré-determinados ao longo de 365 dias, o tamanho de partícula (nm), o índice de polidispersão (PDI) e o potencial Zeta (mV) das

formulações foram monitorados. As análises foram realizadas em triplicata (25 °C) para todas as amostras.

A Figura 9 mostra os resultados do monitoramento da estabilidade físico-química a longo prazo das formulações. Pode-se observar que após 365 dias de monitoramento, a formulação controle (F5) exibiu tamanho de partícula igual a $303,5 \pm 46,3$ nm, estatisticamente maior ($p < 0,05$) que os demais NLC analisados, com maior flutuação de tamanho das partículas em função do tempo.

Em relação ao tamanho de partícula, apenas a formulação F8 não apresentou alterações estatisticamente significativas ($p = 0,09$) ao longo do tempo. No entanto, nenhum sistema à base de OE monitorado tendeu a aumentar de tamanho ao longo do tempo, que indicaria algum processo de instabilidade físico-química, como aglutinação de nanopartículas. Deve-se ressaltar que flutuações nos valores de parâmetros biofísicos são esperadas em formulações coloidais, uma vez que são complexamente organizadas e governadas por elevada energia cinética. Os tamanhos médios das partículas iniciais foram: F1 = $246,9 \pm 5,6$ nm, F2 = $251,2 \pm 5,3$ nm, F3 = $259,8 \pm 1,4$ nm, F4 = $265,6 \pm 16,4$ nm, F5 = $299,4 \pm 33,4$ nm, F6 = $258,9 \pm 6,9$ nm, F7 = $245,8 \pm 11,0$ nm, F8 = $262,3 \pm 23,6$ nm, F9 = $238,2 \pm 2,5$ nm, F10 = $242,1 \pm 5,0$ nm e F11 = $265,8 \pm 24,4$ nm. Após 365 dias de monitoramento, os tamanhos médios foram: 248,5 $\pm$ 10,9 nm (F1), de 245,1 $\pm$ 6,4 nm (F2), de 255,8 $\pm$ 13,2 nm (F3), de 254,5 $\pm$ 17,3 nm (F4), de 303,5 $\pm$ 46,3 nm (F5), de 247,6 $\pm$ 17,7 nm (F6), de 265,3 $\pm$ 24,4 nm (F7), de 261,0 $\pm$ 11,4 nm (F8), de 254,6 $\pm$ 18,7 nm (F9), de 232,0 $\pm$ 15,2 nm (F10) e de 261,5 $\pm$ 30,5 nm (F11).

O PDI tem um papel importante na estabilidade física e na uniformidade dos sistemas nanoparticulados (Shimojo *et al.*, 2019). Uma formulação de nanocarreadores lipídicos bem sucedida requer a preparação de um sistema contendo partículas de tamanhos homogêneos (monodispersas), ou seja, com grau de uniformidade em relação ao tamanho. Seus valores devem ser os mais baixos possíveis para garantir estabilidade a longo prazo, sendo valores iguais ou inferiores a 0,2 usualmente aceitos para descrever uma distribuição monodispersa, conforme o requerido para sistemas de DDS (Danael *et al.*, 2018).

No que tange aos valores de PDI, as formulações apresentaram distribuição monodispersa, que após 365 dias apresentaram valores médios variando de 0,11 a 0,23 entre os sistemas contendo OE em sua estrutura, enquanto a NLC controle

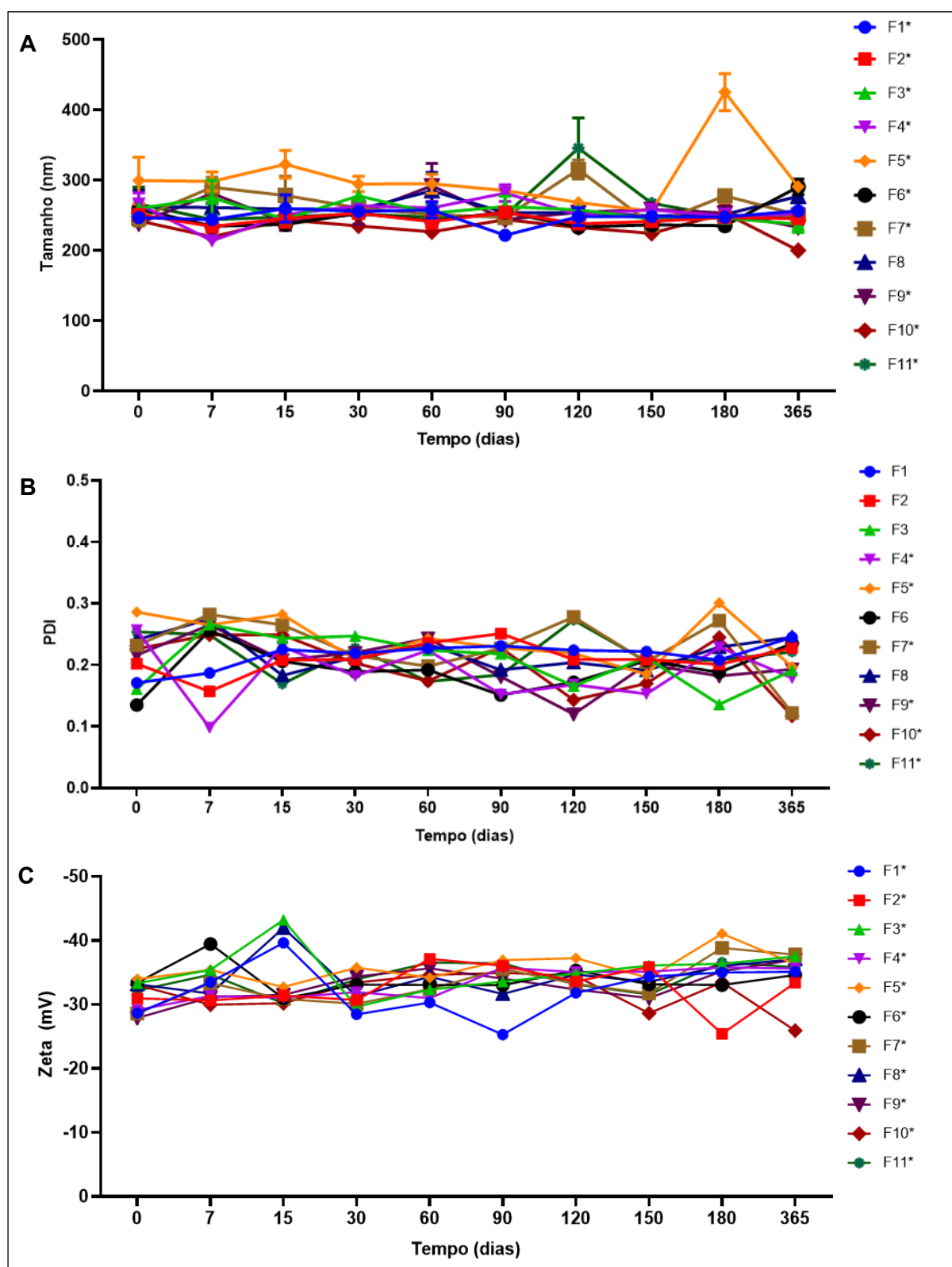
apresentou PDI médio de 0,24. Nesse parâmetro, as formulações F1 ($p = 0,36$), F2 ($p = 0,45$), F3 ($p = 0,08$), F6 ($p = 0,05$) e F8 ($p = 0,22$) não apresentaram mudanças significativas ao longo do tempo. No entanto, todos os sistemas apresentaram distribuição uniforme dos tamanhos após 365 dias de análise.

Formulações de nanocarreadores com distribuição de tamanho constante e estreita estão correlacionadas com melhores resultados clínicos (Danaei *et al.*, 2018). Ainda, a presença de OE além da bioatividade, também faz parte da própria estrutura do NLC, o que proporciona menor viscosidade e cristalinidade à matriz lipídica. Desta forma, o OE foi responsável por diminuir e tornar mais uniforme a distribuição de tamanhos das partículas nas nanoformulações. Isso garante seu papel estrutural além de ser bioativo no sistema (Ribeiro *et al.*, 2021).

O potencial Zeta também permite fazer previsões sobre a estabilidade de dispersões aquosas coloidais (Souto *et al.*, 2004). Em geral, uma boa estabilidade é alcançada com valores de potencial Zeta acima de ± 25 mV, garantindo a estabilização eletrostática total da dispersão coloidal (Thatipamula *et al.*, 2011). Para sistemas estericamente estabilizados, ou seja, que utilizam surfactantes não-iônicos como o poloxamer, os valores de Zeta estão mais relacionados à composição da amostra, tendendo a apresentar valores ligeiramente ou moderadamente negativos (Scioli Montoto; Muraca; Ruiz, 2020). Espera-se que não haja tendência de queda nos valores obtidos ao longo do tempo, indicando uma estabilidade eletrocinética coloidal desejável.

Após 365 dias de monitoramento, o valor médio do potencial Zeta da formulação controle foi de -35,7 mV. Entre os sistemas contendo OE, os valores variaram de -32,2 a -35,2 mV. Neste parâmetro, todos NLC apresentaram variações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo. Porém, exibiram valores distantes de zero, demonstrando boa repulsão eletrocinética entre partículas, sugerindo excelente estabilidade físico-química das amostras armazenadas a 25 °C por pelo menos 12 meses. Além disso, durante avaliação visual não foi observada separação de fases nas formulações durante o período analisado.

Figura 9 - Estabilidade físico-química das formulações NLC em termos de tamanho (A), PDI (B) e potencial Zeta (C), ao longo de 365 dias à 25 °C (n = 3).
PDI: Índice de Polidispersão.



One way ANOVA/Tukey foram usados para analisar diferenças estatísticas intragrupo; *p < 0,05.

Uma vez que a estabilidade físico-química garantiu o controle de qualidade das formulações, o próximo passo foi avaliar a eficácia *in vitro* destes sistemas. Assim, as formulações de NLC preparadas foram submetidas a ensaios microbiológicos *in vitro* para determinação da CIM, relacionada à sua capacidade antimicrobiana frente as cepas multirresistentes de *A. baumannii* (cepa OXA-23; cepa POA4-28 e cepa 65JF), *K. pneumoniae* (cepa ATCC700603, cepa Sensível e cepa Bactray) e *P. aeruginosa* (cepa IMP-1 e cepa PAO-1).

A Tabela 3 exhibe as formulações que demonstraram atividade contra as cepas bacterianas selecionadas e seus respectivos valores de CIM. Assim, o ensaio de microdiluição mostrou que as formulações F1, F6, F7 e F8 demonstraram atividade antimicrobiana contra todas as cepas das espécies bacterianas testadas. Os valores de CIM encontrados para as formulações foram: F1 = 0,80 a 1,19 mg/mL⁻¹, F6 = 1,25 a 5,00 mg/mL⁻¹, F7 = 1,20 a 4,81 mg/mL⁻¹ e F8 = 1,25 a 5,00 mg/mL⁻¹. Desta forma, F1 foi a formulação mais eficaz contra o crescimento de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*.

No que tange à sensibilidade microbiana, os dados mostram que o isolado *A. baumannii* POA4-28 foi o único que teve seu crescimento inibido por todas formulações contendo OE de orégano encapsulado (F2, F9 e F10), exibindo valores de CIM de 1,25 a 3,27 mg/mL⁻¹. Além disso, este isolado de *A. baumannii* foi o mais sensível ao tratamento com formulações que continham OE de canela encapsulado. Essas formulações obtiveram as menores CIM (F1 = 0,80 mg/mL⁻¹, F7 = 1,20 mg/mL⁻¹, F6 e F8 = 1,25 mg/mL⁻¹) entre as NLC testadas.

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima (mg/mL⁻¹) de NLC frente às diferentes cepas bacterianas.

Espécies Cepas	Tratamento mg/mL ⁻¹						
	F1	F2	F6	F7	F8	F9	F10
<i>A. baumannii</i>							
OXA-23	1,19±0,00	> 5,00	3,33±2,89	1,60±2,78	3,33±1,44	> 4,90	> 5,00
POA4-28	0,80±0,34	1,25±0,00	1,25±0,00	1,20±0,00	1,25±0,00	3,27±2,83	2,08±0,72
65JF	1,19±0,00	0,00±0,00	5,00±0,00	3,20±1,39	2,50±0,00	> 4,90	> 5,00
<i>K. pneumoniae</i>							
ATCC700603	1,19±0,00	> 5,00	5,00±0,00	4,81±0,00	5,00±0,00	> 4,90	> 5,00
bacray	1,19±0,00	> 5,00	2,50±0,00	2,40±0,00	2,50±0,00	> 4,90	> 5,00
sensível	1,19±0,00	> 5,00	2,50±0,00	2,40±2,41	2,50±0,00	> 4,90	> 5,00
<i>P. aeruginosa</i>							
IMP-1	1,19±0,00	> 5,00	2,50±0,00	2,40±0,00	2,50±0,00	> 4,90	> 5,00
PAO-1	1,19±0,00	> 5,00	5,00±0,00	4,81±0,00	4,17±1,44	> 4,90	> 5,00

O ensaio microbiológico apontou que, de todos os sistemas analisados, a formulação F1 composta por OE de canela, manteiga de ucuúba e estabilizada por poloxamer, apresenta-se como o tratamento mais promissor a ser empregado futuramente contra as infecções bacterianas multirresistentes de cepas semelhantes às espécies testadas, uma vez que foi capaz de inibir todas as cepas analisadas, na menor concentração possível. Em testes subsequentes, esta formulação passou a ser denominada NLC/CAN e seu correspondente controle de NLC.

Um estudo semelhante conduzido por pesquisadores da Universidade de Belgrado também revelou que o OE de canela apresentou atividade antibacteriana promissora e preveniu tanto a formação de biofilme quanto a erradicação de biofilmes pré-formados de cepas de *A. baumannii*. Apontou também que os efeitos antibacteriano e antibiofilme foram potencializados devido o processo de nanoemulsificação (Ganić *et al.*, 2022).

Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* também demonstraram sensibilidade ao OE de canela em concentrações muito baixas, sendo o efeito bactericida do OE da casca de canela superior ao da folha, provavelmente devido a presença de Σ -cinamaldeído, seu majoritário componente (85,3 % da composição total do OE da casca). Além disso, este OE induziu a morte rápida de *P. aeruginosa* PAO-1 com uma redução significativa na densidade bacteriana dentro de 30 minutos de

exposição ao OE em concentrações $\geq 0,25$ % (v/v), possivelmente devido ao comprometimento da membrana celular bacteriana (Elcocks; Spencer-Phillips; Adukwu, 2020). Isolados clínicos de *P. aeruginosa* com altos níveis de resistência a antibióticos convencionais tiveram seu crescimento inibido pelo OE de canela, supostamente devido a uma ação sinérgica entre as moléculas bioativas que compõem o OE, afetando a expressão gênica e a atividade das bombas de efluxo bacteriana. Alguns genes *mex* da bomba de efluxo foram subexpressos na presença do OE de canela, resultando em morte bacteriana após 16 a 18 h (Coseriu *et al.*, 2023).

Após avaliar a atividade antimicrobiana e identificar a nanoformulação mais efetiva contra as bactérias analisadas, foi realizada a caracterização estrutural da formulação que encapsulava OE de canela, da formulação controle (sem OE) e de todos os excipientes.

A Figura 10A ilustra os espectros obtidos na análise FTIR-ATR. Esta técnica objetiva identificar as possíveis interações ocorridas entre os excipientes utilizados no preparo das nanopartículas. O espectro do OE de canela revelou bandas de absorção intensas em 1672 cm^{-1} (estiramento C=O do aldeído), 1628 cm^{-1} (estiramento C=C do alceno), 1450 cm^{-1} (C-C no anel aromático) (Bashiri *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2020b). Este perfil de espectro foi atribuído à presença de cinamaldeído como componente do OE de canela (Gende *et al.*, 2008).

No espectro vibracional da manteiga de ucuúba, apresentam-se bandas características centradas em 2915 cm^{-1} e um conjunto de bandas entre 1393 e 1177 cm^{-1} , correspondentes à vibração $-\text{CH}_2$. Também foram evidenciadas bandas acentuadas centradas em 1732 e 2848 cm^{-1} relacionadas à vibração C=O e O-CH₂, respectivamente (Ribeiro *et al.*, 2021).

O surfactante poloxamer apresentou bandas típicas de éteres de cadeia alifática centradas em 2880 e 1348 cm^{-1} , associadas às vibrações $\nu\text{O-CH}_2$ e $\nu\text{O-C-O}$, respectivamente. Neste mesmo espectro, foram evidenciadas bandas características da deformação simétrica δCH_2 em 1470 cm^{-1} , bem como o estiramento axial do CO (νCO) em 1098 cm^{-1} (Ribeiro *et al.*, 2016).

Os espectros de NLC/CAN e de NLC revelaram bandas características desses sistemas resultantes da sobreposição da maioria das bandas de manteiga de ucuúba e poloxamer, conforme o esperado (Ribeiro *et al.*, 2021).

No entanto, o espectro de NLC/CAN demonstrou que a banda de absorção nas regiões 2852 - 2883 cm^{-1} tornou-se menos intensa quando comparada ao espectro de 2850 - 2916 cm^{-1} de NLC, indicando o encapsulamento do OE, que também exibiu bandas de absorção em 2860 – 2880 cm^{-1} . Ainda, no espectro NLC/CAN foi detectada ausência das bandas de absorção em 1672, 1628 e 1450 cm^{-1} observadas no OE de canela, sugerindo que houve uma excelente miscibilidade entre a manteiga de ucuúba e o OE, revelando que o OE, além do papel bioativo exerce também papel estrutural na formação do NLC.

A Figura 10B exibe os termogramas de todos os excipientes, formulação de NLC controle (sem OE de canela) e NLC contendo OE de canela. A formulação NLC/CAN apresentou perfil térmico compatível com sua matriz lipídica sólida e semelhante ao ponto de fusão da manteiga de ucuúba em 45,5 °C (Ribeiro *et al.*, 2021), com ponto de fusão centrado em 47,1 °C, maior que a temperatura fisiológica ou patológica, além de manter-se termicamente estável até 100 °C, sem nenhum evento térmico relacionado à degradação de ácidos graxos, conforme o requerido para este tipo de sistema.

A Figura 11 mostra as imagens MEV de NLC/CAN e de NLC. Ambas formulações apresentaram nanopartículas em formas esféricas e com contornos bem delimitados, conforme esperado para este tipo de sistema. Além disso, as imagens revelaram que a presença de OE na estrutura do NLC contribuiu para a obtenção de uma nanopartícula com superfície aparentemente mais uniforme, confirmando que o OE também é parte da própria estrutura do NLC e confere menor cristalinidade para a matriz lipídica (Ribeiro *et al.*, 2021).

Figura 10 - Espectros de FTIR-ATR na região compreendida entre 4000-500 cm^{-1} (A) e termograma obtido por DSC (B) de NLC/CAN, NLC e seus excipientes.

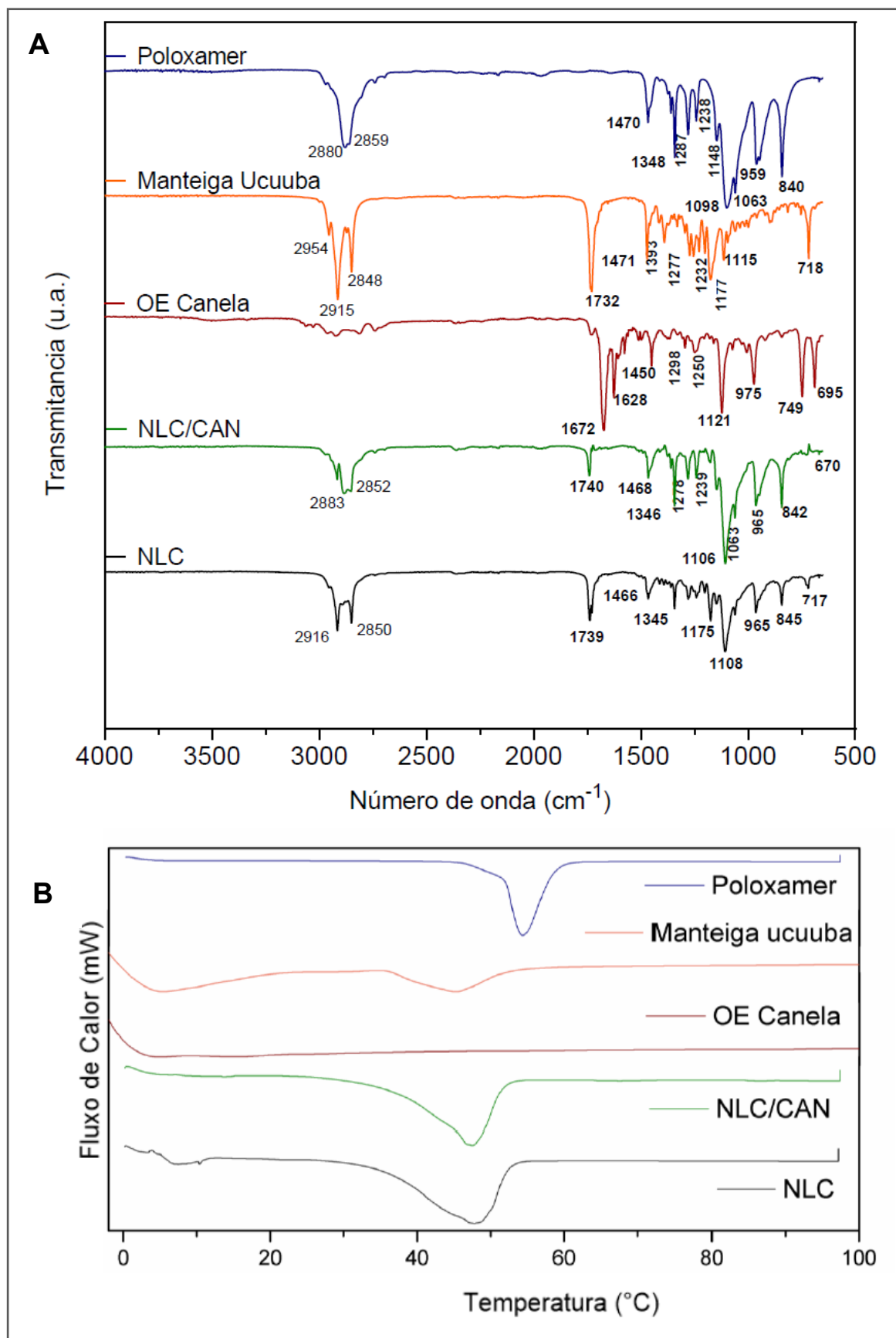
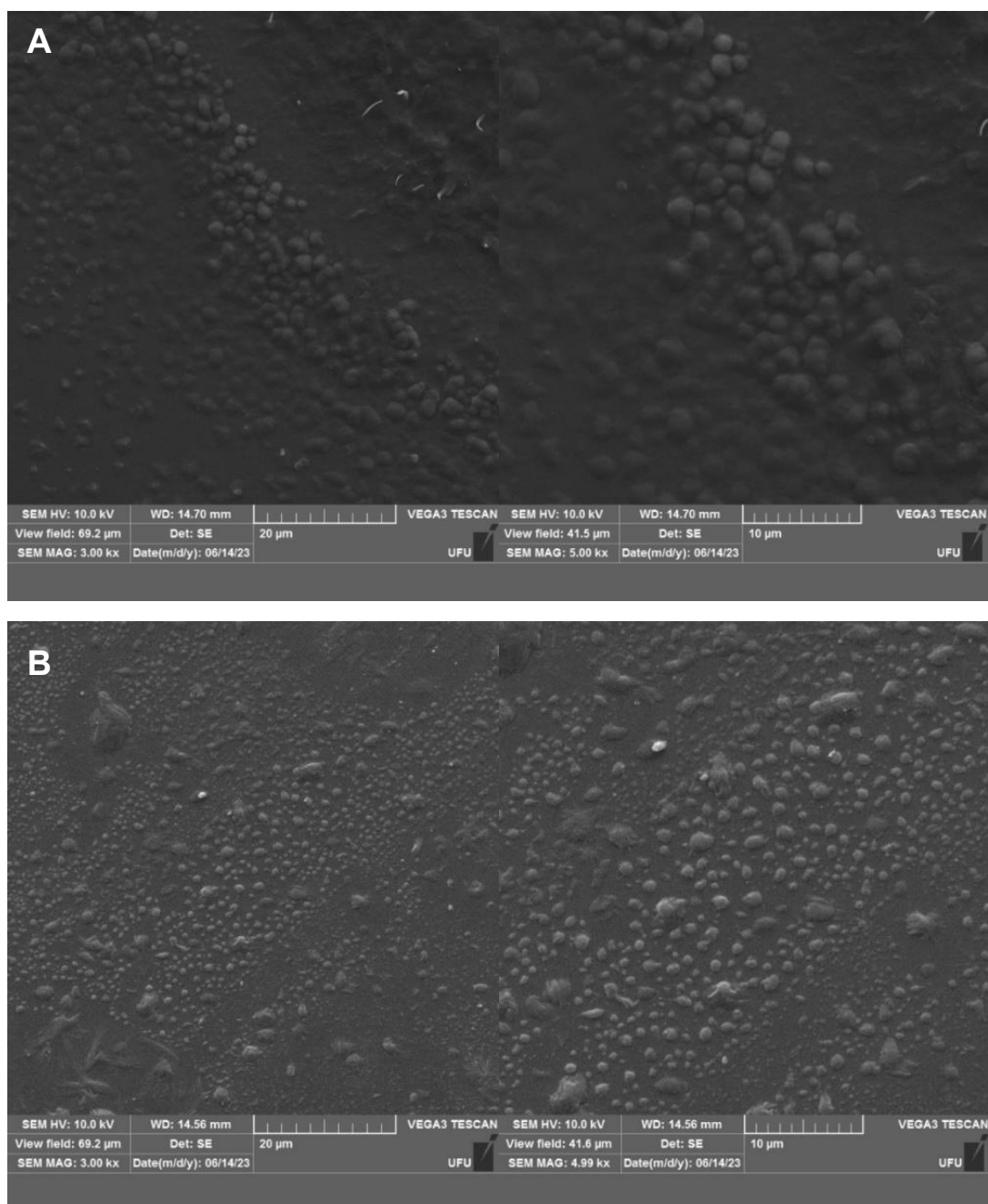


Figura 11 - Microscopia Eletrônica de Varredura de NLC contendo OE de canela (A) e de NLC controle, sem OE (B). As imagens estão disponíveis em duas magnificações diferentes: 3.000 vezes (esquerda) e 5.000 vezes (direita).



De acordo com as análises realizadas para caracterização estrutural, os excipientes e ativos selecionados para o preparo das formulações de NLC do presente trabalho demonstraram compatibilidade entre si.

Assim, o próximo passo foi elucidar a sua segurança através de teste de nanotoxicidade por modelo biológico *in vivo* alternativo de embrião de galinha. Este

ensaio foi realizado para fornecer resultados factíveis da possível toxicidade das formulações desenvolvidas. Utilizou-se como amostra controle OE de canela emulsionado com poloxamer (ambos na mesma concentração da formulação de NLC) em comparação com NLC/CAN e NLC. Além disso foi possível determinar a dose segura a ser utilizada em um futuro ensaio de eficácia *in vivo* da formulação.

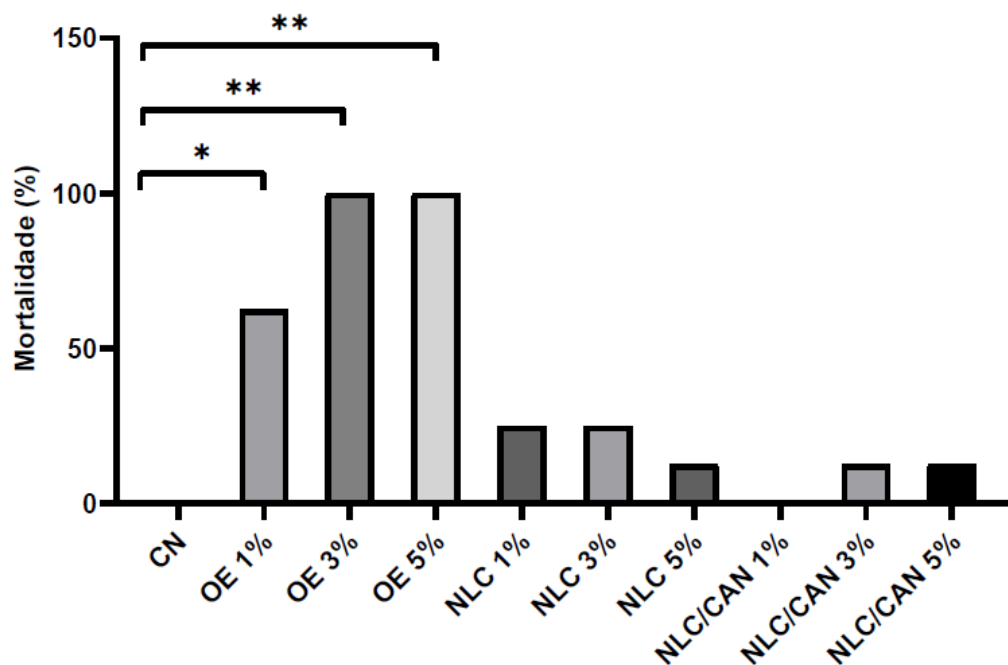
A Figura 12 mostra o gráfico de viabilidade dos embriões tratados com: OE de canela emulsificado, solução salina (controle negativo - CN), NLC/CAN e NLC controle. O ensaio demonstrou que não houve diferença estatística entre NLC/CAN e o CN e nem em relação a NLC controle, garantindo a segurança da nanoformulação. Além disso, entre os embriões vivos não foram detectadas alterações macroscópicas estatisticamente significativas em relação ao CN.

Em contrapartida, a emulsão do OE de canela nas concentrações de 5, 3 e 1 %, apresentou alta toxicidade em comparação ao CN ($p < 0,05$), resultando em uma taxa de mortalidade embrionária de 100, 100 e de 62,5 %, respectivamente, após 24 h da inoculação.

Os OE são misturas complexas cujas características básicas são aroma e sabor intensos. São constituídos principalmente por compostos orgânicos que apresentam diversas atividades biológicas, como antioxidante e antimicrobiana, mas que devido à sua elevada volatilidade, toxicidade, sensibilidade à temperatura, luminosidade, oxidação e hidrólise têm aplicação clínica reduzida (Katopodi; Detsi, 2021).

Entretanto, em virtude de suas atividades biológicas, o encapsulamento dos OE em nanosistemas é um pré-requisito para garantir sua proteção e entrega segura, permitindo assim sua aplicação biomédica. O aprisionamento de OE em carreadores aumenta sua estabilidade oxidativa, termoestabilidade, fotoestabilidade e tempo de prateleira. Além disso, permite a liberação controlada dos compostos bioativos, aumenta sua solubilidade e estabilidade em água, melhora a biodisponibilidade, bioatividade e reduz eventuais efeitos tóxicos (Dajic Stevanovic *et al.*, 2020). Ainda, existem evidências de que a exposição contínua de bactérias a diferentes OE, como o OE de canela, não aumenta a resistência bacteriana ao composto natural. Acredita-se que isso se deva à estrutura complexa dos OE e seus diferentes mecanismos de ação (Becerril; Nerín; Gómez-Lus, 2012).

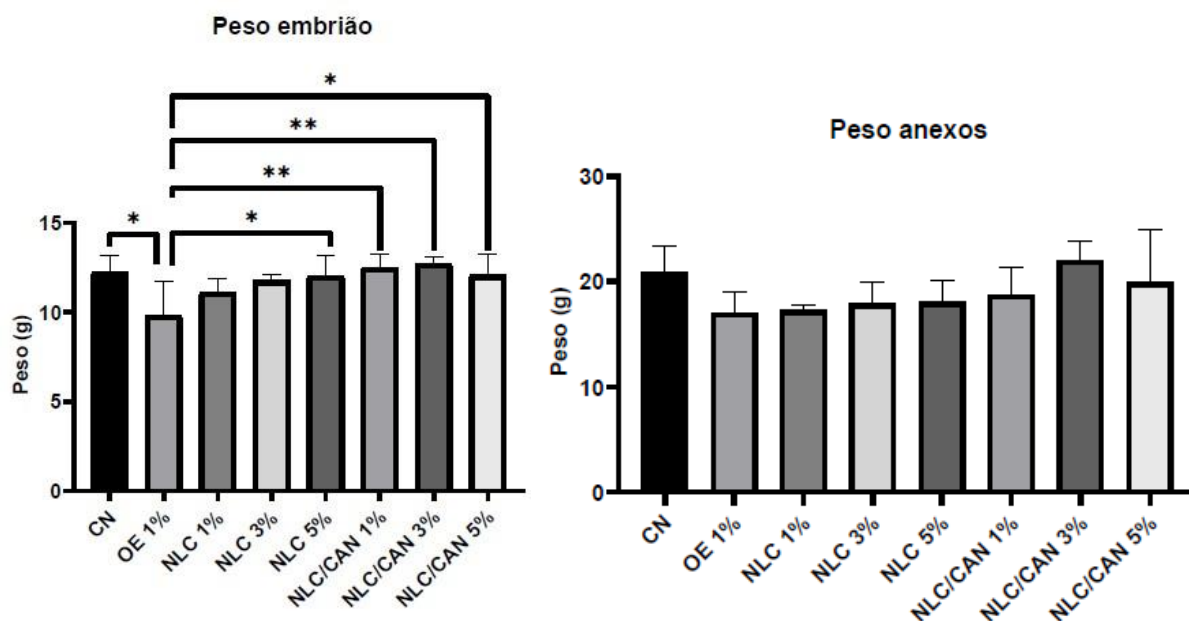
Figura 12 - Viabilidade de embriões de galinha tratados com NLC/CAN, NLC, OE de canela emulsificado (OE) em diferentes concentrações.



n = 8; CN = solução salina 0,8 %. O teste estatístico qui-quadrado seguido da análise da diferença entre duas proporções foi empregado em relação ao CN e todos os outros grupos.

Com relação às alterações de peso, a Figura 13A demonstra que houve diferença estatística ($p < 0,05$) no peso dos embriões tratados com OE emulsificado em relação ao CN. Os resultados mostram ainda que o grupo tratado com o OE de canela emulsificado teve o menor ganho de peso embrionário em relação aos demais tratamentos, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo tratado com NLC controle 5 % e aos grupos tratados com NLC/CAN de diferentes concentrações. Finalmente, não foi detectada diferença estatística significativa em relação à alteração do peso dos anexos em todos os tratamentos em relação ao CN (Figura 13B).

Figura 13 - Alteração do peso dos embriões de galinha (A) e dos seus anexos (B) sob tratamento com NLC/CAN, NLC, OE de canela emulsificado (OE) em diferentes concentrações.



n = 8; CN = solução salina 0,8 %. Foi usado o teste estatístico ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Tukey considerando um $p < 0,05$.

Acreditamos que NLC/CAN é um sistema promissor que contribui para a saúde pública mantendo ativa a pesquisa científica direcionada ao desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas eficazes contra bactérias multirresistentes, sendo economicamente viável para ser empregado na sanitização de ambientes hospitalares. No entanto, mais estudos são necessários para permitir sua produção em larga escala e disponibilização para os serviços de saúde.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos até o presente momento indicam que as formulações de NLC que encapsularam OE apresentaram excelente estabilidade a longo prazo (um ano, a 25°C). Com relação ao potencial antimicrobiano contra *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, a formulação NLC/CAN foi o sistema mais promissor para ser empregado como futuro tratamento de infecções bacterianas causadas pelas bactérias estudadas.

As caracterizações estruturais confirmaram compatibilidade entre os excipientes e organização supramolecular compatível com formulações de NLC, além de estabilidade térmica por até 100 °C, tornando os sistemas aptos a serem utilizados em aplicações biomédicas.

A avaliação da nanotoxicidade em embriões mostrou que a formulação de NLC/CAN foi segura em todas as condições testadas, exercendo um efeito protetor frente a nanotoxicidade dos OE livres. Com base nesses resultados, pretende-se seguir com estudos de eficácia *in vivo* para dar continuidade na busca de uma opção terapêutica eficaz, segura e de baixo custo contra infecções por bactérias multirresistentes.

REFERÊNCIAS

ALIZADEH BEHBAHANI, B. *et al.* Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2020, p. 1-8, 30 abr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/5190603>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2020/5190603/>. Acesso em: 24 jul. 2023.

ANDRADE, L. N.; DARINI, A. L. C. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse? **Journal of Infection Control**, Brasil, v. 6, n. 1, p. 16-25, 2017. Disponível em: <https://jic-abih.com.br/index.php/jic/article/view/173>. Acesso em: 24 jul. 2023.

ANGANE, M. *et al.* Essential oils and their major components: an updated review on antimicrobial activities, mechanism of action and their potential application in the food industry. **Foods**, Basel, v. 11, n. 3, p. 464, 4 fev. 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11030464>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/3/464>. Acesso em: 24 jul. 2023.

AGENCIA NACIONAL DE VIGIÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC No 318, de 6 de Novembro de 2019**. Estabelece os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos[...]. Brasília: Diário Oficial da União, 2019. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3898778/RDC_318_2019_COMP.pdf/20d98e2a-f699-43c6-b3e6-ae090d9ef009. Acesso em: 2 jun. 2023.

AGENCIA NACIONAL DE VIGIÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Nota Técnica nº 347/2021 - CGLAB/DAEVS/SVS/MS**. Dispõe de orientações para auxiliar os laboratórios de microbiologia do Brasil na escolha de antimicrobianos [...]. Brasília: ANVISA, 2021. Disponível em: <https://brcast.org.br/wp->

content/uploads/2022/09/NOTA-TECNICA-ACINETOBACTER-2021.pdf. Acesso em: 23 jun. 2023.

ARAÚJO, D. R.; RIBEIRO, L. N. DE M.; PAULA, E. Lipid-based carriers for the delivery of local anesthetics. **Expert Opinion on Drug Delivery**, Londres, v. 16, n. 7, p. 701-714, 3 jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1629415>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17425247.2019.1629415>. Acesso em: 24 jul. 2023.

ASBAHANI, A. El. *et al.* Essential oils: from extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 483, n. 1-2, p. 220-243, 10 abr. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.iipharm.2014.12.069>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378517314009661?via%3Dihub>. Acesso em: 24 jul. 2023.

BASHIRI, S. *et al.* Preparation and characterization of chitosan-coated nanostructured lipid carriers (CH-NLC) containing cinnamon essential oil for enriching milk and anti-oxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, [s.l.], v. 119, p. 108836, 1 fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108836>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643819311788>. Acesso em: 14 jun. 2023.

BATCHELDER, J. I.; HARE, P. J.; MOK, W. W. K. Resistance-resistant antibacterial treatment strategies. **Frontiers in Antibiotics**, Switzerland, v. 2, 30 jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/frabi.2023.1093156>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/frabi.2023.1093156/full>. Acesso em: 24 jul. 2023.

BECERRIL, R.; NERÍN, C.; GÓMEZ-LUS, R. Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to oregano and cinnamon essential oils. **Foodborne Pathogens and Disease**, Nova York, v. 9, n. 8, p. 699-705, ago. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.1097>. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/fpd.2011.1097>. Acesso em: 24 jul. 2023.

BRAGA, I. A. *et al.* Multi-hospital point prevalence study of healthcare-associated infections in 28 adult intensive care units in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, Inglaterra, v. 99, n. 3, p. 318-324, jul. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.03.003>. Disponível em: [https://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195-6701\(18\)30141-5/fulltext](https://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195-6701(18)30141-5/fulltext). Acesso em: 24 jul. 2023.

BRUN, P. *et al.* *In vitro* antimicrobial activities of commercially available tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oils. **Current Microbiology**, Nova York, v. 76, n. 1, p. 108-116, 12 jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1594-x>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-018-1594-x>. Acesso em: 24 jul. 2023.

CARBONE, C. *et al.* Mediterranean essential oils as precious matrix components and active ingredients of lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, Netherlands, v. 548, n. 1, p. 217-226, 5 set. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.iipharm.2018.06.064>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378517318301415>. Acesso em: 24 jul. 2023.

direct.com/science/article/abs/pii/S0378517318304630?via%3Dihub. Acesso em: 24 jul. 2023.

CASTRO, S. R. *et al.* **Carreadores lipídicos nanoestruturados antimicrobianos**. Depositante: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. BR 102019026730-5A2. Depósito: 15 dez. 2019. Publicação Nacional: 29 jun. 2021a.

CASTRO, S. R. *et al.* A pre-formulation study of tetracaine loaded in optimized nanostructured lipid carriers. **Scientific Reports**, England, v. 11, n. 1, p. 21463, 2 nov. 2021b. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99743-6>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-99743-6>. Acesso em: 24 jul. 2023.

CHUKWUMA, I. F. *et al.* African and Holy Basil - a review of ethnobotany, phytochemistry, and toxicity of their essential oil: current trends and prospects for antimicrobial/anti-parasitic pharmacology. **Arabian Journal of Chemistry**, [s.l.], v. 16, n. 7, p. 104870, 1 jul. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104870>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535223003325?via%3Dihub>. Acesso em: 24 jul. 2023.

CIMINO, C. *et al.* Essential oils: pharmaceutical applications and encapsulation strategies into lipid-based delivery systems. **Pharmaceutics**, Switzerland, v. 13, n. 3, p. 1-35, 1 mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030327>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/3/327>. Acesso em: 24 jul. 2023.

COLQUHOUN, J. M.; RATHER, P. N. Insights into mechanisms of biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* and implications for uropathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Switzerland, v. 10, 29 maio 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00253>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00253/full>. Acesso em: 24 jul. 2023.

COSERIU, R. L. *et al.* Antibacterial effect of 16 essential oils and modulation of *mex* efflux pumps gene expression on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: is cinnamon a good fighter? **Antibiotics**, Switzerland, v. 12, n. 1, p. 163, 12 jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010163>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/12/1/163>. Acesso em: 24 jul. 2023.

DAJIC STEVANOVIC, Z. *et al.* Natural macromolecules as carriers for essential oils: from extraction to biomedical application. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s.l.], v. 8, 25 jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00563>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.00563/full>. Acesso em: 24 jul. 2023.

DANAEI, M. *et al.* Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, Switzerland, v. 10, n. 2, p. 57, 18 maio 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/10/2/57>. Acesso em: 24 jul. 2023.

DUPUIS, V. *et al.* Nanodelivery of essential oils as efficient tools against antimicrobial resistance: a review of the type and physical-chemical properties of the delivery systems and applications. **Drug Delivery**, England, v. 29, n. 1, p. 1007-1024, 31 dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2056663>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10717544.2022.2056663>. Acesso em: 24 jul. 2023.

ELCOCKS, E. R.; SPENCER-PHILLIPS, P. T. N.; ADUKWU, E. C. Rapid bactericidal effect of cinnamon bark essential oil against *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, England, v. 128, n. 4, p. 1025-1037, 17 abr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14538>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/128/4/1025/6715249?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 24 jul. 2023.

EL-KATTAN, N.; ALLAM, K. A. M. The antibacterial activity of nano-encapsulated basil and cinnamon essential oils against certain multidrug-resistant bacteria recovered from infected wounds. **Novel Research in Microbiology Journal**, Egypt, v. 5, n. 6, p. 1447-1462, 1 dez. 2021. DOI: <https://doi.org/10.21608/nrmj.2021.207867>. Disponível em: https://nrmj.journals.ekb.eg/article_227881.html. Acesso em: 24 jul. 2023.

ELSHAFIE, H. S.; CAMELE, I. An overview of the biological effects of some mediterranean essential oils on human health. **BioMed Research International**, London, v. 2017, 5 nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/9268468>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/9268468/>. Acesso em: 24 jul. 2023.

FAZLY BAZZAZ, B. S. *et al.* Solid lipid nanoparticles carrying *Eugenia caryophyllata* essential oil: the novel nanoparticulate systems with broad-spectrum antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**, England, v. 66, n. 6, p. 506-513, jun. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/lam.12886>. Disponível em: <https://academic.oup.com/lambio/article-abstract/66/6/506/6699126?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 24 jul. 2023.

FREIRE, M. P. *et al.* Impact of COVID-19 on healthcare-associated infections: antimicrobial consumption does not follow antimicrobial resistance. **Clinics**, España, v. 78, p. 100231, 1 jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinsp.2023.100231>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1807593223000674?via%3Dihub>. Acesso em: 24 jul. 2023.

GANIĆ, T. *et al.* Cinnamon essential oil and its emulsion as efficient antibiofilm agents to combat *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 13, 10 out. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.989667>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.989667/full>. Acesso em: 03 jun. 2023.

GENDE, L. *et al.* Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus larvae* from Argentine. **Bulletin of Insectology**, [s.l.], v. 61, n. 1, p. 1-4, 2008. Disponível em: <http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol61-2008-001-004gende.pdf>. Acesso em: 24 jul. 2023.

GERONIMO, G. *et al.* Development of S75:R25 bupivacaine-loaded lipid nanoparticles functionalized with essential oils for treating melanoma. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Chichester, v. 96, n. 8, p. 2197-2207, 17 ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.6715>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.6715>. Acesso em: 25 jul. 2023.

GUIDOTTI-TAKEUCHI, M. *et al.* Essential oil-based nanoparticles as antimicrobial agents in the food industry. **Microorganisms**, Basel, v. 10, n. 8, 1 ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081504>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/8/1504>. Acesso em: 25 jul. 2023.

JACKSON-DAVIS, A. *et al.* A review of regulatory standards and advances in essential oils as antimicrobials in foods. **Journal of Food Protection**, [s.l.], v. 86, n. 2, p. 100025, fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2022.100025>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X22000370?via%3Dihub>. Acesso em: 25 jul. 2023.

KANT, R.; KUMAR, A. Review on essential oil extraction from aromatic and medicinal plants: techniques, performance and economic analysis. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, [s.l.], v. 30, p. 100829, 1 dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100829>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2352554122002339?via%3Dihub>. Acesso em: 25 jul. 2023.

KARIMI-KHORRAMI, N. *et al.* Fabrication, characterization, and performance of antimicrobial alginate-based films containing thymol-loaded lipid nanoparticles: comparison of nanoemulsions and nanostructured lipid carriers. **International Journal of Biological Macromolecules**, Netherlands, v. 207, p. 801-812, 15 maio 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.149>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813022006201?via%3Dihub>. Acesso em: 25 jul. 2023.

KARIYAWASAM, R. M. *et al.* Antimicrobial resistance (AMR) in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis (November 2019-June 2021). **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, England, v. 11, n. 1, p. 45, 7 dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13756-022-01085-z>. Disponível em: <https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-022-01085-z>. Acesso em: 25 jul. 2023.

KASKATEPE, B. *et al.* Antibacterial effects of cinnamon oil against carbapenem resistant nosocomial *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 81, p. 191-194, 1 mar. 2016. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.058>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669015305598?via%3Dihub>. Acesso em: 25 jul. 2023.

KATOPODI, A.; DETSI, A. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers of natural products as promising systems for their bioactivity enhancement: the case of essential oils and flavonoids. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s.l.], v. 630, p. 127529, dez. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127529>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0939641113000088?via%3Dihub>. Acesso em: 25 jul. 2023.

KUMAR, V. *et al.* **Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças Tradução da 9ª edição**. Tradução: Adriana Pittella Sudré e colaboradores. 9. ed. São Paulo: Elsevier, 2016. 2696 p. Título original: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.

LAMMARI, N. *et al.* Plant oils: From chemical composition to encapsulated form use. **International Journal of Pharmaceutics**, Netherlands, v. 601, p. 120538, maio 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120538>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378517321003434?via%3Dihub>. Acesso em: 25 jul. 2023.

LOMBREA, A. *et al.* A recent insight regarding the phytochemistry and bioactivity of *Origanum vulgare* L. essential oil. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 21, n. 24, p. 9653, 17 dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21249653>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/24/9653>. Acesso em: 25 jul. 2023.

LU, M. *et al.* Bactericidal property of oregano oil against multidrug-resistant clinical isolates. **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, v. 9, 5 out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02329>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02329/full>. Acesso em: 25 jul. 2023.

MAN, A. *et al.* Antimicrobial activity of six essential oils against a group of human pathogens: a comparative study. **Pathogens**, Switzerland, v. 8, n. 1, p. 15, 28 jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens8010015>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/8/1/15>. Acesso em: 25 jul. 2023.

MICHELI, G. *et al.* The hidden cost of COVID-19: focus on antimicrobial resistance in bloodstream infections. **Microorganisms**, Switzerland, v. 11, n. 5, p. 1299, 16 maio 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051299>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/5/1299>. Acesso em: 25 jul. 2023.

MURRAY, C. J. L. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, England, v. 399, n. 10325, p. 629-655, fev. 2022. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(21\)02724-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)02724-0/fulltext). Acesso em: 25 jul. 2023.

NEMATLAB, M. *et al.* Formulation of cinnamon (*Cinnamomum verum*) oil loaded solid lipid nanoparticles and evaluation of its antibacterial activity against multi-drug resistant *Escherichia coli*. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, London, v. 22, n. 1, 1 dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-022-03775-y>. Disponível em: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-022-03775-y>. Acesso em: 25 jul. 2023.

O'NEILL, J. **The review on antimicrobial resistance. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations**. [s.l.: s.n.], 2016. Relatório técnico. Disponível em: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf. Acesso em: 25 jul. 2023.

OSME, S. F. *et al.* Costs of healthcare-associated infections to the Brazilian public Unified Health System in a tertiary-care teaching hospital: a matched case-control study. **Journal of Hospital Infection**, London, v. 106, n. 2, p. 303-310, out. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.07.015>. Disponível em: [https://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195-6701\(20\)30346-7/fulltext](https://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195-6701(20)30346-7/fulltext). Acesso em: 25 jul. 2023.

PALMAS, L. *et al.* Entrapment of *Citrus limon* var. *pompia* essential oil or pure citral in liposomes tailored as mouthwash for the treatment of oral cavity diseases. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 13, n. 9, p. 216, 28 ago. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph13090216>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/13/9/216>. Acesso em: 25 jul. 2023.

PANDA, S. K. *et al.* Recent advances to combat ESKAPE pathogens with special reference to essential oils. **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, v. 13, 6 dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1029098>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.1029098/full>. Acesso em: 25 jul. 2023.

PANG, Z. *et al.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**, England, v. 37, n.1, p. 177-192, 1 jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975018301976?via%3Dihub>. Acesso em: 25 jul. 2023.

PATRA, J. K. *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, England, v. 16, n. 1, p. 71, 19 dez. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>. Disponível em: <https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-018-0392-8>. Acesso em: 25 jul. 2023.

PLATI, F.; PAPI, R.; PARASKEVOPOULOU, A. Characterization of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum*) particles produced by the novel nano spray drying technique. **Foods**, Switzerland, v. 10, n. 12, p. 2923, 25 nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10122923>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/12/2923>. Acesso em: 25 jul. 2023.

PORMOHAMMAD, A. *et al.* Global prevalence of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: a systematic review and meta-analysis. **Microbial Pathogenesis**, England, v. 139, p. 103887, 1 fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103887>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401019313695?via%3Dihub>. Acesso em: 25 jul. 2023.

RAWSON, T. M.; WILSON, R. C.; HOLMES, A. Understanding the role of bacterial and fungal infection in COVID-19. **Clinical Microbiology and Infection**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 9-11, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.09.025>. Disponível em: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(20\)30577-2/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(20)30577-2/fulltext). Acesso em: 25 jul. 2023.

RIBEIRO, L. N. DE M. *et al.* Hybrid pectin-liposome formulation against multi-resistant bacterial strains. **Pharmaceutics**, Basel, v. 12, n. 8, p. 769, 14 ago. 2020a. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080769>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/12/8/769>. Acesso em: 25 jul. 2023.

RIBEIRO, L. N. M. *et al.* **Composição de carreadores lipídicos nanoestruturados naturais com intrínseca ação anestésica, bactericida, antifúngica e biopesticida**. Depositante: Universidade Estadual de Campinas-Unicamp; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. BR102019009921-6A2. Depósito: 15 maio 2019. Publicação Nacional: 01 dez. 2020b.

RIBEIRO, L. N. DE M. *et al.* Nanocarriers from natural lipids with *in vitro* activity against *Campylobacter jejuni*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Switzerland, v. 10, 8 jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.571040>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.571040/full>. Acesso em: 25 jul. 2023.

RIBEIRO, L. N. M. *et al.* Nanostructured lipid carriers as robust systems for topical lidocaine-prilocaine release in dentistry. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 93, p. 192-202, 10 out. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.08.030>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0928098716303190?via%3Dihub>. Acesso em: 25 jul. 2023.

RIBEIRO, L. N. M. *et al.* Natural lipids-based NLC containing lidocaine: from pre-formulation to *in vivo* studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 106, p. 102-112, 30 ago. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.060>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0928098717302993?via%3Dihub>. Acesso em: 25 jul. 2023.

SANTOS, G. S. DOS *et al.* Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas destinadas à aplicação tópica de dapsona. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 7, p. 1388-1394, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100->

[40422012000700019](https://doi.org/10.40422012000700019). Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/HyWY8VMBb4bKxRmC5Cg5MFh/?lang=pt>. Acesso em: 25 jul. 2023.

SAPORITO, F. *et al.* Essential oil-loaded lipid nanoparticles for wound healing. **International Journal of Nanomedicine**, New Zealand, v. 13, p. 175-186, dez. 2017. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S152529>. Disponível em: <https://www.dovepress.com/essential-oil-loaded-lipid-nanoparticles-for-wound-healing-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>. Acesso em: 25 jul. 2023.

SARWAR, W.; ALI, Q.; AHMED, S. Microscopic visualization of the antibiofilm potential of essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. **Microscopy Research and Technique**, Hoboken, v. 85, n. 12, p. 3921-3931, 17 dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/jemt.24243>. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jemt.24243>. Acesso em: 25 jul. 2023.

SCIOLI MONTOTO, S.; MURACA, G.; RUIZ, M. E. Solid lipid nanoparticles for drug delivery: pharmacological and biopharmaceutical aspects. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [s.l.], v. 7, 30 out. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.587997>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2020.587997/full>. Acesso em: 25 jul. 2023.

SHIMOJO, A. A. M. *et al.* Evaluation of the influence of process parameters on the properties of resveratrol-loaded NLC using 2² full factorial design. **Antioxidants**, Basel, v. 8, n. 8, p. 272, 3 ago. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox8080272>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/8/8/272>. Acesso em: 25 jul. 2023.

SILVA GÜNDEL, S. *et al.* Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. **Microbial Pathogenesis**, England, v. 118, p. 268-276, maio 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.043>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401017313475?via%3Dihub>. Acesso em: 24 jul. 2023.

SOUTO, E. B. *et al.* Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 58, n. 1, p. 83-90, jul. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.02.015>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S093964110400061X?via%3Dihub>. Acesso em: 25 jul. 2023.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIHA, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 2016, p. 1-21, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/3012462>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2016/3012462/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

TACCONELLI, E. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet**

Infectious Diseases, United States, v. 18, n. 3, p. 318-327, 1 mar. 2018. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(17\)30753-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(17)30753-3/fulltext). Acesso em: 25 jul. 2023.

THATIPAMULA, RP. *et al.* Formulation and *in vitro* characterization of domperidone loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. **Daru**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 23-32, 2 fev. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22615636/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 79, n. 7, p. R1231-R1249, jul. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>. Disponível em: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1750-3841.12492>. Acesso em: 25 jul. 2023.

WANG, G. *et al.* The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 17, n. 17, p. 6278, 28 ago. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/17/17/6278>. Acesso em: 25 jul. 2023.

WANG, Z. *et al.* A naturally inspired antibiotic to target multidrug-resistant pathogens. **Nature**, England, v. 601, n. 7894, p. 606-611, 27 jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04264-x>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-04264-x>. Acesso em: 25 jul. 2023.

WEN, M. M. *et al.* Nanophyto-gel against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infection. **Drug Delivery**, England, v. 28, n. 1, p. 463-477, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1889720>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10717544.2021.1889720>. Acesso em: 25 jul. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2021**. Geneva: WHO, [s.n.], 2021. Relatório técnico. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240027336>. Acesso em: 23 jun. 2023.

YAO, J. *et al.* Recent advances in strategies to combat bacterial drug resistance: antimicrobial materials and drug delivery systems. **Pharmaceutics**, Switzerland, v. 15, n. 4, p. 1188, 7 abr. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041188>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/4/1188>. Acesso em: 25 jul. 2023.

YU, Z. *et al.* The alarming antimicrobial resistance in ESKAPEE pathogens: can essential oils come to the rescue? **Fitoterapia**, Milan, v. 140, p. 104433, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104433>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0367326X1932091X?via%3Dihub>. Acesso em: 25 jul. 2023.

ZHANG, X. *et al.* *In vitro* evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of *Melaleuca alternifolia* essential oil. **BioMed Research International**, United States, v. 2018, p. 1-8, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/2396109>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/2396109/>. Acesso em: 25 jul. 2023.