



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO DE  
COPAÍBA (*Copaifera officinalis*) E DE SUA COMBINAÇÃO COM ÁCIDO ANACÁRDICO**

MARCELA GUIMARÃES LANDIM

BRASÍLIA  
2019

MARCELA GUIMARÃES LANDIM

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera officinalis*) E DE SUA COMBINAÇÃO COM ÁCIDO ANACÁRDICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Graziella Anselmo Joanitti.

BRASÍLIA  
2019

MARCELA GUIMARÃES LANDIM

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO DE  
COPAÍBA (*Copaifera officinalis*) E DE SUA COMBINAÇÃO COM ÁCIDO ANACÁRDICO

COMISSÃO EXAMINADORA:

---

Profa. Dra. Graziella Anselmo Joanitti  
(Orientadora)

---

Profa. Dra. Cynthia Maria Kyaw  
(Membra titular)

---

Profa. Dra. Patrícia Bento da Silva  
(Membra titular)

---

Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo  
(Membro suplente)

Brasília, 20 de fevereiro de 2019.

*Dedico este trabalho aos nossos ancestrais que primeiro descobriram o valor dos nossos recursos naturais e souberam utilizá-los de forma sustentável e respeitosa, transmitindo esses saberes aos seus descendentes.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, João e Shirley, por todo o apoio, amor e carinho que eles têm me dado ao longo da minha vida. Vocês são essenciais à minha existência e fonte de inspiração! Amo vocês infinitamente! Agradeço também à minha amada irmã, Gaby, pelo apoio, amor, cuidado e companheirismo, ao meu cunhado Anderson; aos meus avós, aos meus tios, em especial à tia Cleila e ao tio Márcio pelo apoio e pelos conselhos de vida e profissionais, e aos meus primos. Agradeço também à todas as circunstâncias que me trouxeram até aqui.

Gostaria de agradecer especialmente ao meu companheiro conjugal, Luca Mammoli, por todo amor, paciência, apoio e carinho, à toda a sua família pelo carinho e acolhimento, e aos nossos filhos felinos Cora e Milton.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Profa. Dra. Graziella Joanitti, pela paciência, didática, atenção, apoio, engajamento e confiança em mim e nos membros do LCBNano. Você é uma excelente orientadora! MUITÍSSIMO obrigada!

Outro agradecimento especial à minha co-orientadora, Profa. Dra. Mariana Souza Castro, pela paciência, carinho, apoio e confiança. Você também é uma excelente professora!

Além desses, sou muito grata aos meus companheiros do grupo LCBNano por todo o apoio, troca de ideias e companheirismo. Juntos, nós alcançamos muito mais!!

Agradeço também à todos alunos, professores e técnicos do Laboratório de Nanobiotecnologia, em especial aos meus amigos Victor Hugo e à Jaqueline, pelo companheirismo, carinho, apoio e bom humor; à Marina Sampaio, pelo companheirismo, apoio, carinho e risadas; à Amanda Fernandes, pelo apoio e companheirismo; ao Henrique, à Alicia, à Jaque (Sol), à Rayanne pelo apoio técnico e informacional em alguns experimentos e pela amizade.

Agradeço ao pessoal do laboratório de Toxinologia, em especial à Gislene pelo seu carinho, apoio, generosidade, boas risadas e trocas de ideias, e ao pessoal do bloco das Ciências Fisiológicas, em especial ao Prof. Dr. Osmino Pires Jr. e sua orientanda Ana Carolina pelo suporte e manutenção da sala de Microbiologia; aos técnicos Danilo e Elias, à Profa. Dra. Elisabeth Schwartz, pelo uso da leitora de fluorescência, e seus alunos (Diogo, Gabriel, Daniel) pelo suporte e companheirismo.

Agradeço enormemente aos meus amigos que me acompanharam até aqui, ofertando muito carinho, momentos memoráveis, compartilhando felicidades e angústias e contribuindo para a construção e reconstrução do meu ser!

Agradeço a todos que colaboraram com este trabalho, oferecendo suporte material, como a professora Izabel Cristina Rodrigues da Silva (FCE/UnB), que concedeu uma parte da resazurina, e o professor Luiz Romeiro, que concedeu o ácido anacárdico ao nosso grupo de pesquisa.

Agradeço à Universidade de Brasília por oferecer a sua estrutura física e pessoal, responsável pela minha formação acadêmica, em especial aos meus professores da Graduação e da Pós-Graduação.

Por fim, agradeço à CAPES, CNPq, INCT e FAP-DF pelo fomento à minha pesquisa.

A vocês, minha eterna gratidão!

**“We have found it of paramount importance that in order to progress we must recognize our ignorance and leave room for doubt. Scientific knowledge is a body of statements of varying degrees of certainty — some most unsure, some nearly sure, but none *absolutely* certain.”**

“Nós achamos de suma importância que para progredirmos, devemos reconhecer nossa ignorância e deixar espaço para a dúvida. O conhecimento científico se trata de muitas premissas que variam em graus de certeza - algumas muito incertas, outras quase certas, mas nenhuma *absolutamente* certa.”

Richard Feynman (1918 - 1988)

## RESUMO

Diversas são as patologias associadas a agentes etiológicos bacterianos, e para controlar as infecções causadas por bactérias, existem disponíveis no mercado diversas classes de antibióticos. Entretanto, o crescente número de casos de resistência bacteriana aos antibióticos convencionais disponíveis é um cenário que tem alarmado entidades governamentais mundialmente. Dentre as bactérias que apresentam grande versatilidade e capacidade de desenvolver resistência a antimicrobianos encontra-se o *Staphylococcus aureus*. Esta bactéria, embora seja um comensal do corpo humano, pode se tornar um patógeno oportunista, sendo o agente etiológico de diversas infecções, como osteomielite, endocardite, infecções de cicatrizes, intoxicações alimentares, infecções pleuropulmonares e síndrome do choque tóxico estafilocócico. Cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (em inglês *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, *MRSA*) e a outros antibióticos de primeira-linha são uma das principais causas de infecção hospitalar no mundo e estima-se que duas em cada cem pessoas são portadoras de *MRSA*. Com isso, evidencia-se a urgência no desenvolvimento de novos tratamentos contra infecções. Identificar compostos que são simultaneamente eficazes e de baixa toxicidade é o grande desafio, e neste contexto, a bioprospecção de moléculas encontradas na biodiversidade brasileira pode revelar compostos promissores ao tratamento de infecções, além de agregar valor aos ecossistemas. No presente trabalho, desenvolveu-se e caracterizou-se uma nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (*Copaifera officinalis*), e avaliou-se a sua atividade antibacteriana solo e da sua combinação com o ácido anacárdico ( $C_{15:0}$ ) livre, em cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Esta nanoemulsão foi caracterizada quanto ao seu diâmetro hidrodinâmico, potencial-Zeta e índice de polidispersão, cujos valores respectivamente foram iguais a  $180,4 \text{ nm} \pm 2,6 \text{ nm}$ ,  $-35,1 \text{ mV} \pm 0,2 \text{ mV}$  e  $0,295 \pm 0,024$ , e permaneceram estáveis ao longo do tempo de análise de 60 dias. A nanoemulsão de oleorresina de copaíba apresentou atividade antiestafilocócica, assim como o óleo livre. Interessantemente, a quantidade de surfactante utilizado na formulação interferiu na eficácia antimicrobiana, de modo que a formulação com proporção 1:1 (m/m) de surfactante : óleo foi mais eficaz do que a nanoemulsão 2:1 (m/m) ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, foi testada a atividade antimicrobiana do ácido anacárdico  $C_{15:0}$  solo e constatou-se a sua atividade antimicrobiana dose- e tempo-dependente contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Interessantemente, o surfactante lecitina de ovo (majoritariamente fosfatidilcolina) sozinho apresentou toxicidade significativa, de acordo com os ensaios de semeadura em ágar e com a microscopia eletrônica de varredura, embora a nanoemulsão à base da oleorresina de copaíba tenha apresentado maior atividade antimicrobiana. Esta nanoemulsão combinada com o ácido anacárdico



demonstrou uma maior eficácia do que estes dois compostos administrados isoladamente. De acordo com o índice de combinação calculado com o modelo matemático de Chou-Talalay, a combinação entre esses dois componentes pode ser aditiva ou sinérgica, dependendo das concentrações combinadas de cada componente e do tempo de tratamento. Por fim, o surfactante solo apresentou atividade antagônica em combinação com o ácido anacárdico na maioria das concentrações combinadas. Conclui-se que a combinação do ácido anacárdico com a nanoemulsão de oleorresina de copaíba pode apresentar maior eficácia antibacteriana do que esses componentes isolados.

Palavras-chave: antimicrobiano, nanobiotecnologia, óleos naturais, sinergismo, antagonismo, terapia combinatória, lecitina, *Anacardium*, *Copaifera*.

## ABSTRACT

There are several pathologies associated with bacterial etiological agents, and to control infections caused by bacteria, several classes of antibiotics are available on the market. However, the growing number of cases of bacterial resistance to the conventional antibiotics available is a scenario that has alarmed government entities worldwide. Among the bacteria that present great versatility and capability to develop resistance is *Staphylococcus aureus*. Although it is a commensal of the human body, it can become an opportunistic pathogen, being the etiological agent of several infections, such as osteomyelitis, endocarditis, scar infections, food poisoning, pleuropulmonary infections and staphylococcal toxic shock syndrome. Strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and other first-line antibiotics are one of the leading causes of nosocomial infection in the world and it is estimated that two out of every hundred people are carriers of MRSA. With this, it is evident the urgency in the development of new treatments against infections. Identifying compounds that are both effective and of low toxicity is the major challenge, and in this context, the bioprospection of molecules found in Brazilian biodiversity may reveal promising compounds to treat infections, along with the valorization of ecosystems. In the present work, the nanoemulsion based on copaiba oleoresin (*Copaifera officinalis*) was developed and characterized, and its antibacterial activity alone or combined with free anacardic acid (C<sub>15:0</sub>) was evaluated in culture of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. This nanoemulsion was characterized for its hydrodynamic diameter, Zeta-potential and polydispersity index, which values were respectively equal to 180.4 nm ± 2.6 nm, -35.1 mV ± 0.2 mV and 0.295 ± 0.024, and remained stable over the analysis time of 60 days. The copaiba oleoresin nanoemulsion showed anti-staphylococcal activity, as did the free oil. Interestingly, the amount of surfactant used in the formulation interfered with antimicrobial efficacy, so that the one with 1:1 (w/w) ratio of surfactant : oil was more effective than the 2:1 (w/w) nanoemulsion (p < 0,05). Additionally, the antimicrobial activity of C<sub>15:0</sub> anacardic acid was tested and its dose-dependent and time-dependent antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was confirmed. Interestingly, the surfactant egg lecithin (mostly phosphatidylcholine) alone showed significant toxicity, according to the agar plate colony counting and with the scanning electron microscopy, although the nanoemulsion with the copaiba oleoresin presented higher antimicrobial activity. This nanoemulsion combined with anacardic acid demonstrated greater efficacy than these two compounds tested alone. According to the combination index calculated with the Chou-Talalay mathematical model, the combination of these two components may be additive or synergistic, depending on the combined concentrations of each component and the treatment time. Finally, the

surfactant alone presented antagonistic activity in combination with anacardic acid in the majority of the combined concentrations. Therefore, the combination of the anacardic acid with the copaiba oleoresin nanoemulsion resulted in a better antibacterial efficacy than these components isolately.

Keywords: antimicrobial, nanobiotechnology, natural oils, synergism, antagonism, combinatorial therapy, lecithin, Anacardium, Copaifera.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Micrografia eletrônica de varredura de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, mostrando a sua morfologia cocoide e seus arranjos celulares. Autoria própria.....	21
<b>Figura 2.</b> Exsicata de um exemplar de <i>Copaifera officinalis</i> .....	26
<b>Figura 3.</b> Exemplos de moléculas frequentemente encontradas na oleorresina de copaíba.....	28
<b>Figura 4.</b> Estrutura química dos ácidos anacárdicos.....	29
<b>Figura 5.</b> Anatomia da castanha do caju ( <i>Anacardium occidentale</i> ).....	30
<b>Figura 6.</b> Exemplos de nanomateriais.....	32
<b>Figura 7.</b> Esquema ilustrativo dos tipos de nanoemulsão.....	35
<b>Figura 8.</b> Tipos de efeitos decorrentes de terapias combinatórias.....	37
<b>Figura 9.</b> Estabilidade coloidal da nanoemulsão de oleorresina de copaíba NE 1:1 e seu respectivo branco B 1:1, armazenados a 4°C e protegidos da luz, analisada pelos parâmetros: (A) diâmetro hidrodinâmico, (B) índice de polidispersão e (C) potencial Zeta ao longo do tempo.....	52
<b>Figura 10.</b> Viabilidade celular de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 após (A) 6 horas e (B) 16 horas de exposição aos tratamentos: nanoemulsão de copaíba com a proporção (m/m) surfactante : óleo 1:1 (NE 1:1), nanoemulsão de copaíba com a proporção surfactante : óleo 2:1 (NE 2:1), óleo de copaíba livre (OLEO LIVRE), controle de etanol correspondente ao veículo do óleo livre (ETOH), formulação sem óleo com concentração de surfactante igual à da nanoemulsão 1:1 (B- 1:1), formulação sem óleo com concentração de surfactante igual à da nanoemulsão 2:1 (B- 2:1).....	54
<b>Figura 11.</b> Viabilidade celular de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 após (A) 6 horas e (B) 16 horas de tratamento com ácido anacárdico (AA) e o seu veículo dimetilsulfóxido (DMSO).....	58
<b>Figura 12.</b> Viabilidade celular de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 após (A) 6 e (B) 16 horas de tratamento com três concentrações (1,5, 4,5 ou 9,0 mg/mL) de nanoemulsão de óleo de copaíba (NE 1:1), formulação sem óleo de copaíba (B 1:1) e	

óleo de copaíba livre (OL) isolados ou combinados com o ácido anacárdico em três diferentes concentrações (3,12, 6,25 ou 12,5 µg/mL).....60

**Figura 13.** Percentual de colônias relativo ao controle, baseada na quantidade de colônias formadas sobre ágar, no tempo de 24 horas de incubação, após exposição prévia de (A) 6 horas e (B) 16 horas, com cada tratamento com NE/B/OL na concentração de 1,5 mg/mL, AA na concentração de 6,25 µg/mL e suas respectivas combinações (NE+AA, B+AA e OL+AA).....64

**Figura 14.** Integridade de membrana de células de *S. aureus* ATCC 25923, previamente tratadas por (A) 6 horas e (B) 16 horas com NE/B/OL na concentração de 1,5 mg/mL e AA na concentração de 6,25 µg/mL, isolados ou combinados.....68

**Figura 15.** Histogramas da dispersão referentes aos dados de FSC-H e SSC-H das células de *S. aureus* ATCC 25923 previamente tratadas por 6 horas com 6,25 µg/mL de ácido anacárdico; 1,5 mg/mL de NE/B/OL isolados ou combinados com o AA; isopropanol 70%; e controle negativo. A linha vertical cinza indica o ponto onde encontra-se o pico do controle (C-).....70

**Figura 16.** Histogramas da dispersão referentes aos dados de FSC-H e SSC-H das células de *S. aureus* ATCC 25923 previamente tratadas por 16 horas com 6,25 µg/mL de ácido anacárdico; 1,5 mg/mL de NE/B/OL isolados ou combinados com o AA; isopropanol 70% (aplicado após 16 horas de crescimento bacteriano); e controle negativo.....71

**Figura 17.** Micrografias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 após 6 horas de tratamento com: (A) controle negativo; (B) controle positivo C+ (isopropanol); (C) nanoemulsão de oleorresina de copaíba, NE; (D) nanoemulsão e ácido anacárdico, NE+AA; (E) branco, B; (F) branco e ácido anacárdico, B+AA; (G) oleorresina de copaíba livre, OL; (H) oleorresina de copaíba livre e ácido anacárdico, OL+AA; (I) ácido anacárdico, AA.....72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Exemplos de nanomateriais antimicrobianos.....	33
<b>Tabela 2.</b> Características físico-químicas das nanoemulsões da oleoresina de copaíba, NE 1:1 e NE 2:1, e seus respectivos brancos, B 1:1 e B 2:1, com 1 dia de formulação .....	48
<b>Tabela 3.</b> Valores dos índices de combinação (CI) para cada combinação entre NE/B/OL e AA, com 6 horas de tratamento.....	61
<b>Tabela 4.</b> Valores dos índices de combinação (CI) para cada combinação entre NE/B/OL e AA, com 16 horas de tratamento.....	62
<b>Tabela 5.</b> Resumo comparativo dos tratamentos em relação aos seus efeitos antimicrobianos.....	78

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

**AA** - ácido anacárdico

**ANOVA** - análise de variância ( do inglês, analysis of variance)

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**ATCC** - American Type Culture Collection

**ATP** - trifosfato de adenosina

**B** - branco, formulação sem óleo de copaíba

**C15:0** - ácido anacárdico cuja cadeia alquílica contém 15 átomos de carbono e não apresenta ligações insaturadas.

**CI** - índice de combinação (do inglês, combination index)

**CIM** - concentração inibitória mínima

**CBM** - concentração bactericida mínima

**CDC** - Centros para o Controle e Prevenção de Doenças (do inglês, Centers for Disease Control and Prevention)

**DH** - diâmetro hidrodinâmico

**DLS** - espalhamento dinâmico de luz (do inglês, Dynamic Light Scattering)

**DMSO** - dimetilsulfóxido

**DNA** - ácido desoxirribonucleico

**Embrapa** - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

**FabF/B** - sintases da proteína transportadora  $\beta$ -cetoacil-acil

**FDA** - agência norte-americana responsável pela regulação de alimentos e fármacos (do inglês Food and Drug Administration)

**FSC** - espalhamento frontal da luz (do inglês, forward scattering)

**IPD** - índice de polidispersão

**IP** - iodeto de propídio

**ISO** - Organização Internacional para Padronização (do inglês, International Organization for Standardization)

**LPS** - lipopolissacarídeo

**MEV** - microscopia eletrônica de varredura

**MH** - (caldo ou ágar) Mueller-Hinton

**m/m** - proporção de massas

**MRSA** - Staphylococcus aureus resistente à metilina (do inglês, methicillin-resistant Staphylococcus aureus)

**NAD(H)** - nicotinamida adenina dinucleotídeo (do inglês, nicotinamide adenine dinucleotide)

**NE** - nanoemulsão

**OL** - óleo/oleorresina livre

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**PA** - pureza absoluta

**PBP** - proteínas ligadoras de penicilina (do inglês penicillin-binding protein)

**PBS** - solução salina tamponante de fosfato (do inglês, phosphate buffer saline)

**pH** - potencial hidrogeniônico

**PubChem** - banco de dados de informações acerca de moléculas

**PZ** - potencial Zeta

**RNA** - ácido ribonucleico

**RND** - proteínas de efluxo (do inglês, Resistance Nodulation Division)

**rRNA** - ácido ribonucleico ribossomal

**SSC** - espalhamento lateral da luz (do inglês, side scattering)

**tRNA** - ácido ribonucleico transportador

**UFC** - unidade formadora de colônia

**UnB** - Universidade de Brasília

**UTI** - unidade de terapia intensiva

**VBNC** - viáveis mas não-cultiváveis (do inglês, viable but non-culturable)

**v/v** - proporção de volumes



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1. Patógenos bacterianos e multirresistência a fármacos antimicrobianos.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.1. Resistência a antimicrobianos em <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2. Mecanismos de resistência a fármacos antimicrobianos.....</b>	<b>22</b>
<b>1.3. A procura por novos antimicrobianos.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3.1. Óleo de copaíba.....</b>	<b>25</b>
<b>1.3.2. Ácido anacárdico.....</b>	<b>28</b>
<b>1.4. Nanotecnologia e suas aplicações antimicrobianas.....</b>	<b>31</b>
<b>1.4.1. Nanoemulsões.....</b>	<b>34</b>
<b>1.5. Terapia combinatória.....</b>	<b>36</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>40</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1. Objetivo geral.....</b>	<b>42</b>
<b>3.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>42</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1. Formulação das nanoemulsões.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2. Caracterização das nanoemulsões.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3. Ácido anacárdico.....</b>	<b>44</b>
<b>4.4. Testes biológicos <i>in vitro</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>4.4.1. Linhagem celular.....</b>	<b>45</b>
<b>4.4.2. Microdiluição em caldo.....</b>	<b>45</b>
<b>4.4.3. Semeadura sobre ágar para contagem de colônias.....</b>	<b>46</b>
<b>4.4.4. Citometria de fluxo.....</b>	<b>46</b>
<b>4.4.5. Microscopia eletrônica de varredura.....</b>	<b>46</b>
<b>4.5. Testes estatísticos.....</b>	<b>47</b>

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
5.1. Caracterização e análise de estabilidade das nanoemulsões da oleorresina de copaíba.....	48
5.1.1. Caracterização.....	48
5.1.2. Estabilidade ao longo do tempo.....	48
5.2. Testes biológicos.....	53
5.2.1. Teste da influência da proporção de surfactante (lecitina) sobre o efeito antimicrobiano da nanoemulsão à base de óleo de copaíba.....	53
5.2.2. Curva dose-resposta da atividade antibacteriana do ácido anacárdico.....	58
5.2.3. Ensaio de combinação da nanoemulsão e do óleo de copaíba livre com o ácido anacárdico.....	60
5.2.3.1. Teste de microdiluição em caldo, com resazurina.....	60
5.2.3.2. Contagem de colônias em ágar após tratamentos.....	60
5.2.3.3. Citometria de fluxo.....	66
5.2.3.4. Microscopia eletrônica de varredura.....	71
5.2.3.5. Comparação dos resultados de viabilidade celular: ensaio metabólico (resazurina), ensaio de contagem de colônias (células viáveis), citometria de fluxo e microscopia eletrônica de varredura.....	76
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Patógenos bacterianos e multirresistência a fármacos antimicrobianos

Diversas são as patologias associadas a agentes etiológicos bacterianos. Segundo LUNA & SILVA JR. (2013), algumas das doenças bacterianas persistentes e emergentes no Brasil são: tuberculose, meningite, sífilis, gonorreia, hanseníase, tracoma, febre tifóide, febre maculosa e infecções hospitalares.

A tuberculose é uma infecção causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* ou por outras espécies desse mesmo gênero. O principal órgão comprometido pela tuberculose é o pulmão, porém rins, ossos e meninges também podem ser afetados. Os principais sintomas são tosse seca ou com catarro, podendo apresentar sangue, dor torácica, febre sutil vespertina, sudorese noturna, inapetência e emagrecimento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Em 2017, foram registrados no Brasil 73.070 novos casos de tuberculose, e nesse mesmo ano foram registrados 4.534 mortes decorrentes dessa infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a e 2018b).

Uma das infecções que vem causando crescente preocupação no Brasil e no mundo é a sífilis, uma doença sexualmente transmissível provocada pelo agente etiológico *Treponema pallidum*. Nos primeiros estágios da infecção, podem surgir feridas indolores e que não coçam nos locais de entrada da bactéria, geralmente nos órgãos sexuais (pênis, vagina, vulva, ânus). Entretanto, o indivíduo infectado pode ser assintomático ou apresentar o sintomas apenas anos após o contágio. Em 2016 no Brasil, foram contabilizados 87.593 casos de sífilis adquirida, com 185 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Outra doença de alta letalidade que tem alarmado populações das regiões Sudeste e Sul brasileiras nas duas últimas décadas é a febre maculosa, causada pela transmissão da bactéria *Rickettsia rickettsii* por carrapatos do gênero *Amblyomma*. Os sintomas dessa infecção incluem febre alta, dor de cabeça, dores musculares,

mal-estar generalizado, vômitos e exantema maculopapular (manchas vermelhas arredondadas, com formato de líquen). Se não tratada a tempo, pode acometer rins, sistema digestório, sistema nervoso, pulmões e sistema circulatório, levando o paciente à óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). No ano de 2017, foram registrados ao menos 165 casos de febre maculosa no Brasil, destes 119 na região Sudeste e 29 na região Sul (Ministério da Saúde, 2018c).

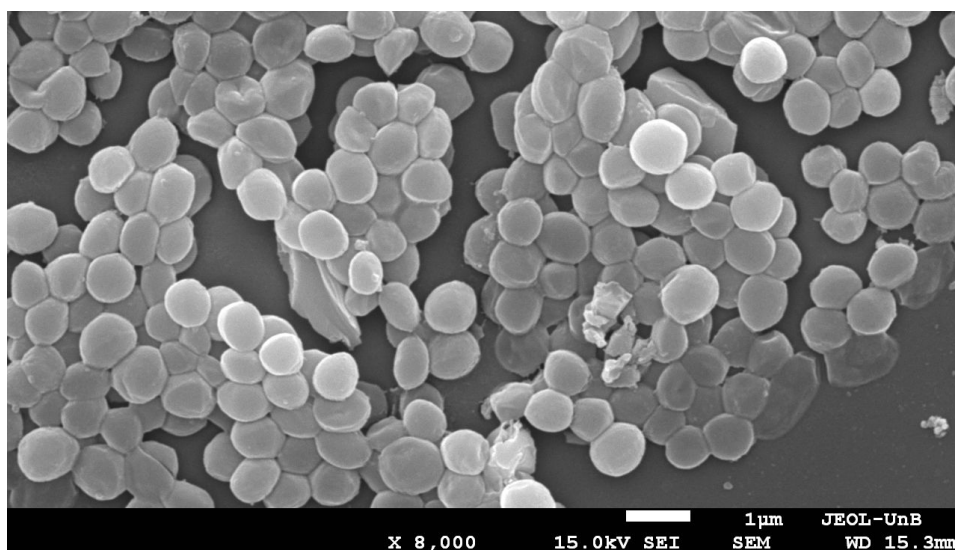
De modo geral, essas infecções têm sido tratadas com sucesso com antibióticos, reduzindo a mortalidade dos pacientes. Entretanto, de acordo com o Sistema de Vigilância Global de Resistência a Antimicrobianos da Organização Mundial de Saúde, têm sido crescentes os surgimentos de bactérias multirresistentes a antibióticos, e as que desenvolvem resistência mais comumente são: *Acinetobacter ssp*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* (Organização Mundial de Saúde, 2017).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2016), a resistência de *Klebsiella pneumoniae* à carbapenemos (KPC) tem se espalhado por todos os continentes, causando infecções hospitalares como pneumonia, septicemia e infecções neonatais em Unidades de Terapia intensiva (UTIs); em alguns países, mais da metade dos pacientes com infecções do sistema urinário causadas por *Escherichia coli* não responde mais ao tratamento com fluoroquinolona; similarmente, o tratamento de último recurso para gonorréia, cujo agente etiológico é a bactéria *Neisseria gonorrhoeae*, à base de cefalosporina de terceira geração, já apresentou resistência em no mínimo 10 países (Austrália, Áustria, Canadá, França, Japão, Noruega, Eslovênia, África do Sul, Suécia e Reino Unido). No Brasil e no mundo, cepas multirresistentes de *S. aureus*, como MRSA e VRSA, têm alarmado autoridades pela sua alta versatilidade em se tornarem resistentes em ambientes hospitalares e até mesmo em ambientes fora de hospitais, vitimando um crescente número de pacientes. No tópico 1.1.1, estas cepas serão discutidas detalhadamente.

### 1.1.1. Resistência a antimicrobianos em *S. aureus*

Um relatório da Organização Mundial da Saúde, Banco Mundial e Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (2018) destaca que entre 7% e 10% (dependendo das condições de desenvolvimento do seu país de origem) dos pacientes hospitalizados devem adquirir alguma infecção hospitalar durante a sua internação. Um dos principais patógenos envolvidos em infecções hospitalares é o *Staphylococcus aureus*.

Esta bactéria Gram-positiva apresenta formato esférico (também denominado cocoide), com diâmetro em torno de 1  $\mu\text{m}$ , e apresenta células agrupadas em arranjo no formato de “cachos de uva”, podendo também apresentar agrupamentos de duas células (**Figura 1**). Quanto às suas características fisiológicas, é tolerante a condições de alta salinidade e baixa oxigenação, sendo anaeróbia facultativa. Está presente na nossa microbiota comensal das vias nasais e axilas, e se tornam patógenos oportunistas em situações de imunossupressão ou quando em contato com o sangue em tecidos lesionados, sendo agente etiológico da osteomielite, da endocardite, do furúnculo, de infecções de cicatrizes, de intoxicações alimentares, de infecções pleuropulmonares e da síndrome do choque tóxico estafilocócico (FOSTER, 1996; TONG *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Micrografia eletrônica de varredura de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mostrando a sua morfologia cocóide e seus arranjos celulares. Autoria própria.

Infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) são as mais comuns em hospitais no Brasil, contribuindo com cerca de metade das infecções hospitalares causadas por *S. aureus*, entre os anos de 2004 e 2007 (ROSSI *et al.*, 2008). Adicionalmente, de acordo com o Centros para o Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention, CDC, 2016*), estima-se que duas em cada cem pessoas são portadoras de MRSA. Esta cepa resistente surgiu em ambientes hospitalares com altos níveis de administração de meticilina e oxacilina. Também tem aumentado o aparecimento de casos de infecções por MRSA contraídas fora do ambiente hospitalar (MRSA adquirida em comunidade) em países da América Latina (MEJÍA, ZURITA & GUZMÁN-BLANCO, 2010).

Frente ao cenário de resistência à meticilina por *S. aureus*, a estratégia comumente adotada foi recorrer ao antibiótico vancomicina para tratar infecções estafilocócicas. Entretanto, têm-se registrado nos últimos anos a ocorrência de cepas de MRSA, adquiridas em comunidade, possuidoras do gene *vanA*, que confere resistência à vancomicina. Essa variedade de *S. aureus* ficou conhecida como VRSA. Em 2002, foi isolado nos Estados Unidos o primeiro caso de resistência total de *S.*

*aureus* à vancomicina, aparecendo casos esporádicos na primeira década dos anos 2000 (MIMICA & BEREZIN, 2006), e em 2012 foi relatado no Brasil o primeiro caso de infecção por VRSA (ROSSI *et al.*, 2014). Esta cepa desenvolve-se quando bactérias do gênero *Enterococcus* transferem plasmídios contendo gene de resistência à vancomicina a bactérias da espécie *S. aureus*. A existência de crescentes casos de MRSA e VRSA revela a versatilidade da bactéria *S. aureus* em se tornar resistente à uma variedade de antibióticos, o que causa crescente preocupação em nível global.

## **1.2. Mecanismos de resistência a fármacos antimicrobianos**

Os mecanismos de resistência a fármacos antimicrobianos podem ser agrupados entre os mecanismos de barreira, que impedem a chegada ou a interação do fármaco com o alvo, e os mecanismos de inativação química dos antibióticos.

Segundo BLAIR e colaboradores (2014), dentre os *mecanismos de barreira* temos:

- A. Redução da permeabilidade aos antimicrobianos: bactérias Gram-negativa já são naturalmente mais resistentes a alguns fármacos pela natureza de sua parede celular, que é composta por mais camadas do que a parede celular das Gram-negativas, dificultando a permeabilização de algumas moléculas e impedindo a sua chegada ao alvo. Uma porta de entrada de algumas moléculas para as camadas mais internas da célula bacteriana Gram-negativa são as proteínas porinas da membrana externa, entretanto sabe-se que algumas bactérias Gram-negativas são capazes de alterar a expressão de porinas, levando a

um aumento da resistência a antimicrobianos quando os genes que codificam as porinas têm sua expressão diminuída.

- B. Proteínas de efluxo: algumas bactérias apresentam proteínas de membrana que expõem os antibióticos do citoplasma para fora das células, diminuindo a concentração intracelular do fármaco e impedindo a sua chegada ao sítio-alvo. Nem sempre essas bombas de efluxo apresentam alta especificidade aos antibióticos, podendo acarretar em multirresistência. Além disso, já foi reportado genes plasmidiais codificadores para bombas de efluxo, por exemplo da proteína RND em *Citrobacter freundii* (DOLEJSKA *et al.* 2013), possibilitando a transferência horizontal desses genes de resistência.
- C. Alteração do sítio-alvo do antibiótico por mutações: este mecanismo ocorre a partir de mutações pontuais no alvo do antibiótico, impedindo a ligação deste, porém sem acarretar a função original do alvo. Por exemplo, mutações pontuais no gene da proteína de ligação à penicilina levam à resistência a beta-lactâmicos em Gram-positivas.
- D. Proteção do sítio-alvo: ligação de outra molécula sem atividade farmacológica produzida pela própria célula bacteriana ao sítio-alvo de um antibiótico previne a sua ligação e impede a sua atividade antimicrobiana.

Diferentemente, os mecanismos de *resistência por inativação* dos fármacos antimicrobianos consistem em (BLAIR *et al.*, 2014):

- A. Inativação por hidrólise: consiste na produção de enzimas que rompem as moléculas antimicrobianas, como no clássico caso das beta-lactamases que hidrolisam os beta-lactâmicos.
- B. Inativação por adição de grupos químicos: há também enzimas que adicionam grupos químicos a antibióticos, como fosfatos, acetilas e nucleotídeos, impedindo a sua ligação ao sítio-alvo.



### 1.3. A procura por novos antimicrobianos

A Organização Mundial da Saúde alerta que em um cenário possível da era pós-antibióticos ainda neste século, infecções comuns e pequenos ferimentos poderiam ser letais (OMS, 2014), além de aumentar os casos de infecções hospitalares e dificultar procedimentos cirúrgicos. Com isso, evidencia-se a urgência no desenvolvimento de novos tratamentos contra infecções.

Identificar compostos que são simultaneamente eficazes e de baixa toxicidade é o grande desafio, e é um dos motivos pelos quais tem ocorrido uma diminuição no lançamento de novos fármacos nos últimos 40 anos (KALAN & WRIGHT, 2011). Neste contexto, a bioprospecção de moléculas contidas na biodiversidade brasileira pode revelar compostos promissores no tratamento de infecções, além de agregar valor aos ecossistemas.

A curcumina é um exemplo de antimicrobianos derivados de plantas e especiarias que apresentou concentração inibitória mínima (CIM) variando entre 5 e 50 µg/mL em 65 isolados clínicos de *Helicobacter pylori* na Índia, além de diminuir a inflamação gástrica causada por essa bactéria em camundongos (DE *et al.*, 2009). MUTLU-INGOK & KARBANCIOGLU-GULER (2017) testaram a atividade antibacteriana contra *Campylobacter jejuni* e *C. coli* dos óleos essenciais de cominho, cardamomo e dil, e obtiveram valores de CIM variando entre 0,012 e 0,050 µL/mL. Os extratos de plantas também são bastante utilizados em pesquisas de antimicrobianos, por exemplo WECKESSER *et al.* (2007) testaram a atividade antimicrobiana de extratos de *Usnea barbata*, alecrim (*Rosmarinus officinalis*), sálvia (*Salvia officinalis*), *Boswellia serrata*, *Harpagophytum procumbens*, *Gentiana lutea*, *Menyanthes trifoliata*, *Bryonia cretica* e *Smilax regelii*, contra diversas cepas Gram-positivas e Gram-negativas, além de *Candida spp.* Foi revelado que *U. barbata*, *R. officinalis* e *H. procumbens* foram as espécies cujos extratos apresentaram maior atividade antimicrobiana contra cepas suscetíveis e resistentes à penicilina ou metecilina de *S. aureus*, com CIM variando entre 2 e 10 µg/mL.

Por sua vez, outros compostos antimicrobianos são derivados de animais como peptídeos antimicrobianos encontrados em secreções de anfíbios, como a hilina a1 extraída do anuro *Hypsiboas albopunctatus* e descrita quanto à sua atividade antimicrobiana por CASTRO *et al.* (2009), apresentando CIM igual a 8 µM contra *S. aureus* ATCC 25923, por exemplo. O veneno da centopeia *Scolopendra subspinipes mutilans* possui os peptídeos chamados escolopina-1 e escolopina-2, cujos efeitos antibacterianos foram testados por PENG e colaboradores (2010), apresentando CIMs contra *S. aureus* ATCC 2576 e um isolado clínico da mesma espécie iguais a, respectivamente, 1,2 a 5,0 µg/mL e 0,5 a 1,0 µg/mL. Inúmeros outros exemplos de compostos antimicrobianos extraídos de animais podem ser encontrados na literatura (BLOWER, BARKSDALE & VAN HOEK, 2015; MASSO-SILVA & DIAMOND, 2014) além daqueles obtidos em fungos (NAVARRI *et al.*, 2016), bactérias (SUMI *et al.*, 2014) e algas (BERRI *et al.*, 2016).

No presente trabalho, foi enfocada a pesquisa da atividade antimicrobiana da oleorresina/óleo de copaíba e do ácido anacárdico, que são compostos muito estudados por sua atividade antimicrobiana e são encontrados em espécies da flora brasileira.

### 1.3.1. Óleo de copaíba

O gênero *Copaifera* contém as espécies vegetais popularmente conhecidas como copaíba, e são pertencentes à família Fabaceae. Suas 26 espécies estão distribuídas nos domínios fitogeográficos da Amazônia, do Cerrado, da Caatinga e da Mata Atlântica, além de também serem encontradas em outros países da América Latina (QUEIROZ, MARTINS-DA-SILVA & COSTA, 2015). A **Figura 2** ilustra uma exsicata de *Copaifera officinalis*, representando algumas características (morfologia e distribuição das folhas, morfologia das flores e inflorescências) desta espécie.

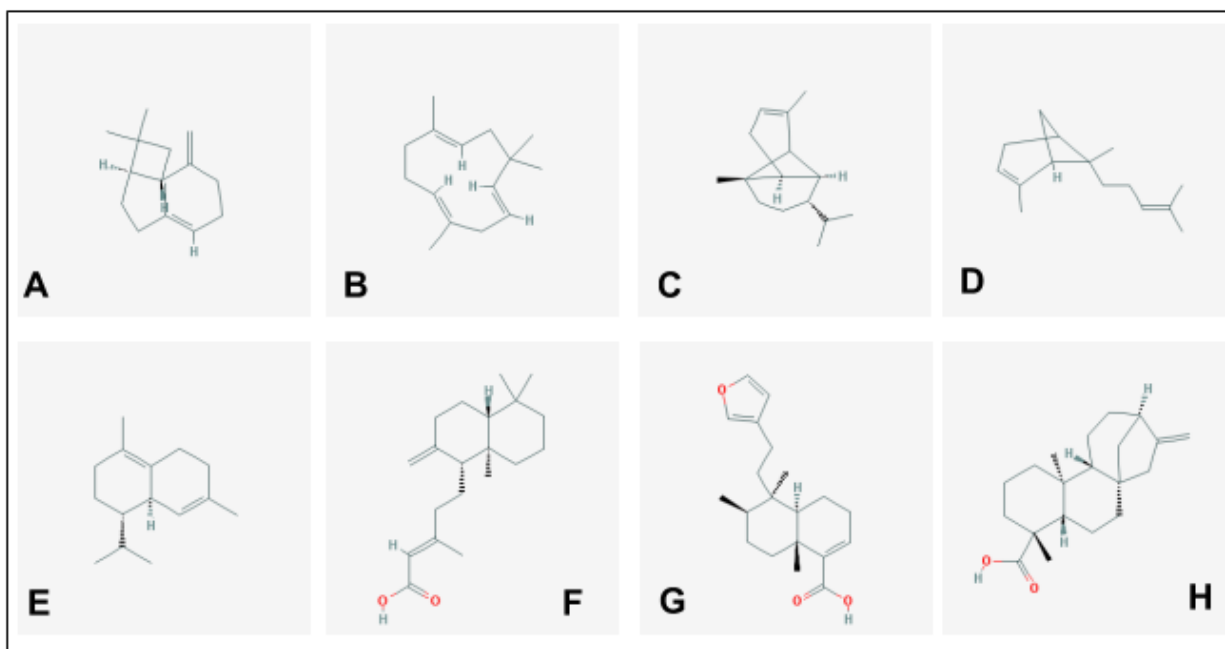


**Figura 2.** Exsicata de um exemplar de *Copaifera officinalis*. Extraída do Herbário Virtual do Programa REFLORA. Fotografia de autoria do Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas (INPA).

Além de sua importância ecológica, este gênero apresenta importância etnofarmacológica, devido à sua oleorresina, conhecida como óleo de copaíba, ser utilizada na medicina popular como cicatrizante, antiinflamatório e antimicrobiano. É crescente o interesse científico por este óleo e inúmeros estudos têm comprovado seus efeitos: antibacteriano (ABRÃO *et al.*, 2015; BARDAJÍ *et al.*, 2016), antiinflamatório (CARVALHO *et al.*, 2005; JUNIOR *et al.*, 2007, MATOS GOMES *et al.*, 2010), cicatrizante (PAIVA *et al.*, 2002), antiparasitário (IZUMI *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2017), antineoplásico (MATOS GOMES *et al.*, 2008; ABRÃO *et al.*, 2015), larvicida (RODRIGUES *et al.*, 2014), entre outros.

ABRÃO e colaboradores (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana em 18 cepas e antineoplásica da oleorresina bruta de *Copaifera langsdorffii* e de frações de moléculas isoladas desse óleo. Eles constataram que o ácido copálico presente no óleo apresentou concentração inibitória mínima (menor concentração de uma substância, na qual não se observa o crescimento bacteriano em meio de cultivo líquido) variando entre 15 µg/mL e 25 µg/mL relativa às cepas de *S. aureus*: WB81-USA 400, W7749-USA 200, ATCC 29213 e um isolado clínico, e demonstraram a atividade dessa molécula contra a formação de biofilme. Em outro trabalho similar, BARDAJÍ e colaboradores (2016) constataram a inibição de bactérias relacionadas à infecções bucais, como *Lactobacillus casei* (isolado clínico), *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975 e isolado clínico), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082 e isolado clínico), *Streptococcus salivarius* (ATCC 10556 e isolado clínico) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), apresentando concentração inibitória mínima variando entre 25 e 100 µg/mL.

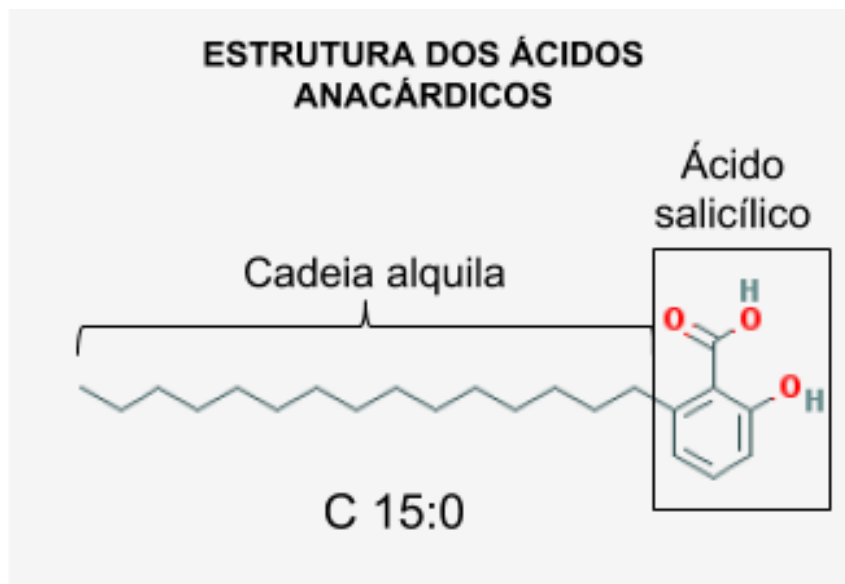
As crescentes descobertas das aplicações farmacológicas desse óleo levaram à investigação de sua composição química. A oleorresina de copaíba é majoritariamente formada por moléculas das classes dos sesquiterpenos e diterpenos, cujas proporções variam entre espécies e variam com a procedência (BIAVATTI *et al.*, 2006; JUNIOR *et al.*, 2007; GELMINI *et al.*, 2013). A **Figura 3** ilustra algumas das moléculas mais abundantes nas oleorresinas encontradas em diferentes espécies de *Copaifera*.



**Figura 3.** Exemplos de moléculas frequentemente encontradas na oleorresina de copaíba. De A-E estão representados os sesquiterpenos, e de F-H estão representados os diterpenos ácidos. (A) beta-cariofileno, (B) alfa-humuleno, (C) alfa-copaeno, (D) alfa-bergamoteno, (E) delta-cadineno, (F) ácido copálico, (G) ácido hardwickiico, e (H) ácido caurenóico. As ilustrações das moléculas foram retiradas do banco de dados *PubChem*, disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

### 1.3.2. Ácido anacárdico

Outra classe de moléculas que vem despertando o interesse de pesquisadores quanto às suas propriedades antimicrobianas é a classe dos ácidos anacárdicos (AA), que são compostos fenólicos, contendo o núcleo do ácido salicílico e uma cadeia lateral hidrocarbônica, que varia em número de carbonos e pode conter de uma a três insaturações (**Figura 4**).



**Figura 4.** Estrutura química dos ácidos anacárdicos. É exemplificado ácido anacárdico C 15:0, que possui uma cadeia alquila com 15 carbonos de comprimento sem insaturações. (Imagem extraída e modificada do banco de dados *PubChem*, disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Os ácidos anacárdicos são isolados do líquido do mesocarpo (casca) da castanha do caju (**Figura 5**), correspondendo a 70% de sua composição. (AGOSTINI-COSTA *et. al.*, 2005). A espécie *Anacardium occidentale* pertence à família Anacardiaceae e é comum na região Nordeste do Brasil. Os estados que mais cultivam essa espécie para fins agrícolas são Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte, sendo majoritariamente produzidos por pequenos agricultores. A exploração do caju se dá em maior parte pelo consumo da castanha e do pedúnculo do caju. (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2016).



**Figura 5.** Anatomia da castanha do caju (*Anacardium occidentale*). Fonte: Embrapa. Autor: Luiz Augusto Lopes Serrano.

Algumas das propriedades farmacológicas conhecidas dos ácidos anacárdicos são: antibacteriana, antitumoral, antioxidante e gastroprotetora (HAMAD & MUBOFU, 2015). Em um estudo conduzido por HIMEJIMA & KUBO (1991), os AAs mostraram-se eficazes contra as bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis* (ATCC 9372), *Brevibacterium ammoniagenes* (ATCC 6872), *Propionibacterium acnes* (ATCC 11827), *S. aureus* (ATCC 12598) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), apresentando CIM igual a 100 µg/mL contra a cepa testada de *S. aureus*. Em outro estudo, KUBO, NIHEI e TSUJIMOTO o ácido anacárdico C<sub>12:0</sub> demonstrou atividade antiestafilocócica em cepas de *S. aureus* resistentes a metilina (ATCC 33591 e ATCC 33592), em testes *in vitro*, apresentando CIM igual a 6,25 µg/mL (KUBO *et al.*, 2003).

Adicionalmente, foi sugerido como mecanismo de ação em bactérias aeróbias obrigatórias a inibição da enzima NADH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) oxidase (KUBO *et al.*, 2003), e de modo geral, o ácido anacárdico possui a propriedade

de desestabilizar membranas, atuando como um detergente (STASIUK & KOZUBEK, 2010)

#### **1.4. Nanotecnologia e suas aplicações antimicrobianas**

Os primórdios da nanotecnologia não são recentes. Desde o Antigo Egito há evidências da sua presença, embora ela fosse utilizada de forma não intencional, seja na forma de nanopartículas de chumbo formadas no processo de fabricação de tintas capilares, ou como a famosa “taça de Lycurgo” na Roma Antiga, conhecida por apresentar colorações distintas quando iluminada pelo lado interno e pelo lado externo, devido a nanopartículas de ouro com tamanhos diferenciados. Há diversos outros achados comprovando que o uso da nanotecnologia esteve presente na cultura de muitos povos antigos (SCHAMING & REMITA, 2015).

Contudo, a consciência da possibilidade de se manipular materiais em nanoescala de forma intencional só foi trazida à tona em 1959, com o discurso de Richard Feynman, na Sociedade Americana de Física. De acordo com seus cálculos, ele demonstrou a possibilidade de se escrever todos os 24 volumes da Encyclopaedia Britannica na cabeça de um alfinete (FEYNMAN, 1960). Mas para isso, seria necessário manipular os átomos do alfinete um por um, o que seria inviável naquela época.

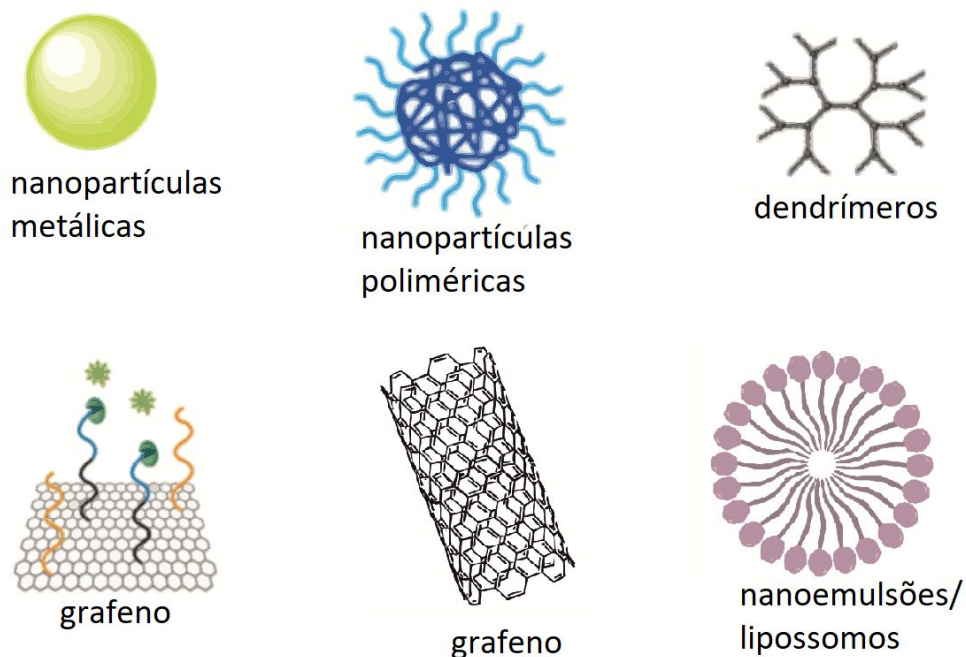
Em 1974, o japonês Norio Tanigushi formalizou o conceito de nanotecnologia, sendo definida como “o processamento ultrafino de materiais com acurácia nanométrica e a criação de mecanismos em nanoescala” (TANIGUSHI, 1974), e a partir da década de 1980, com o advento dos microscópios de tunelamento de varredura e de força atômica, as previsões de Feynman concretizaram o conceito de Tanigushi, possibilitando a exploração pelos cientistas dessa diminuta escala.

Materiais na escala nanométrica, ou seja, cujas dimensões internas ou externas encaixe ao menos uma de suas medidas (largura, altura e/ou profundidade) na faixa entre 1 e 100 nanômetros (ISO/TS 80004:2015)\* apresentam propriedades distintas do mesmo material em escala macrométrica. Para exemplificar, os nanomateriais



apresentam maior razão entre área de superfície por volume, podem apresentar maior atividade catalítica, coloração diferenciada e fluorescência, condutividade elétrica e propriedades magnéticas, que não seriam observadas no mesmo material em escala macroscópica (RODUNER, 2006).

Por sua característica multi- e interdisciplinar, a nanotecnologia apresenta aplicações nas mais diversas áreas, incluindo as ciências da saúde, e dentro desta há um crescente interesse em aplicações antimicrobianas da nanotecnologia para o aumento da eficácia na prevenção, no diagnóstico, e no tratamento de patologias bacterianas. Diversas são as plataformas nanoestruturadas, como: nanopartículas metálicas (ouro, prata, ferro, titânio, zinco), nanotubos de carbono, fulerenos, nanopartículas poliméricas, pontos quânticos (*quantum dots*), dendrímeros, lipossomos, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas (**FIGURA 6**). As mais investigadas para potenciais aplicações antimicrobianas estão na **Tabela 1**.



**Figura 6.** Exemplos de nanomateriais. Adaptado de CENTRUM NANOBIOMEDYCZNE UAM (Polônia). Disponível em: <http://cnbm.amu.edu.pl/en/nanomaterials>

**Tabela 1.** Exemplos de nanomateriais antimicrobianos.

Nanomaterial	Tamanho	Cepas	CIM (CBM)	Referência
Nanopartículas de prata	Não-especificado	<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	5 (20) µg/mL	Li <i>et al.</i> , 2011
	100 nm	<i>S. pyogenes</i> resistente a eritromicina; <i>E. coli</i> resistente a ampicilina; <i>P. aeruginosa</i> multirresistente	66,7 (66,7) mM 83,3 (83,3) mM 83,3 (100) mM	Lara <i>et al.</i> , 2009
Lipossomos	Lipossomos carregados com azitromicina, de 100 nm	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 <i>S. aureus</i> ATCC 33591 (MRSA) <i>E. coli</i> ATCC 25922	0,125 µg/mL 0,25 µg/mL 0,5 µg/mL	Liu <i>et al.</i> , 2016
Pontos quânticos	PQs de carbono dopado com nitrogênio e funcionalizado com amina, de 7 nm	MRSA	Aniquilação das bactéria em 3 h de terapia fotodinâmica.	Kuo <i>et al.</i> , 2018
Nanopartículas poliméricas	NP de alginato com tobramicina, de 505 nm	<i>P. aeruginosa</i> PA01	0,625 µg/mL	Deacon <i>et al.</i> , 2015
	NP polimérica responsiva à beta-lactamase e penicilina-G amidase, carregada com antibióticos, de cerca de 100 nm	MRSA	Depende do antibiótico adicionado à formulação.	Li <i>et al.</i> , 2016
	NPs de quitosana, de 40 nm	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 <i>E. coli</i> K88 <i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>S. typhimurium</i> ATCC 50013	0,25 µg/mL 0,125 µg/mL 0,17 µg/mL 0,25 µg/mL	Qi <i>et al.</i> , 2004

De acordo com a plataforma Google Acadêmico, realizando uma busca com as palavras-chave “nano- s. aureus”, os principais resultados da pesquisa apresentaram artigos sobre nanopartículas de prata, de óxidos metálicos (TiO<sub>2</sub>, ZnO, MgO, CuO, óxidos de ferro) e compósitos do polissacarídeo quitosana. De acordo com um estudo conduzido por AZAM et al. (2012) a respeito da atividade antimicrobiana de nanopartículas de ZnO, CuO e Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, esses óxidos metálicos apresentaram CBM contra *S. aureus* (cepa não-especificada) respectivamente iguais a 16 µg/mL, 22 µg/mL e 80 µg/mL, enquanto o antibiótico tetraciclina, utilizado convencionalmente, apresentou CBM igual a 28 µg/mL. LI e colaboradores (2011) testaram nanopartículas de prata contra *S. aureus* ATCC 6538P e encontraram a CBM de 20 µg/mL para esse nanomaterial, que atua na supercondensação do DNA bacteriano, impedindo a divisão celular. Por fim, nanopartículas de quitosana foram testadas quanto à sua atividade antibacteriana por QI et al. (2004), apresentando CIM e CBM respectivamente iguais a 0,25 µg/mL e 8 µg/mL contra a cepa *S. aureus* ATCC 25923, comparativamente igual aos valores de CIM e CBM do antibiótico doxiciclina.

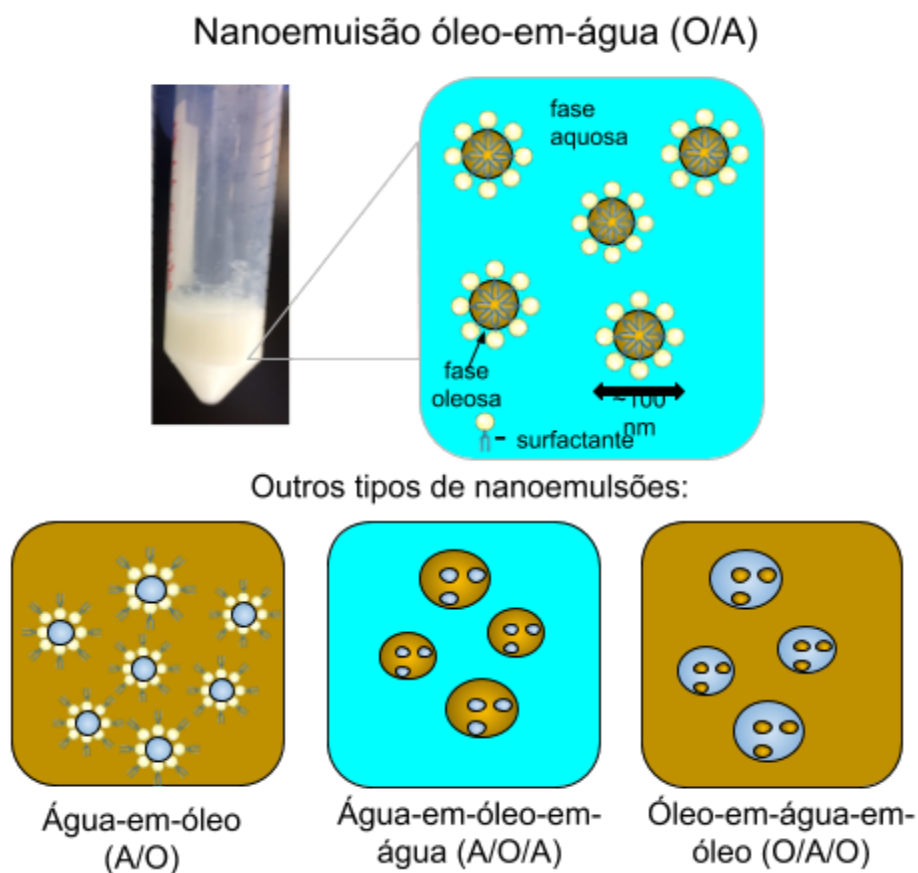
No subtópico 1.3.1, serão abordadas as nanoemulsões e suas aplicações antimicrobianas.

\* A faixa de tamanho dos nanomateriais é variável, não havendo um consenso sobre o limite máximo de tamanho dos nanomateriais. As nanoemulsões, por exemplo, podem apresentar nanogotículas de até 300 nm de diâmetro, segundo ANTON & VANDAMME (2011), mantendo as propriedades da escala nanométrica.

#### **1.4.1. Nanoemulsões**

Nanoemulsões são sistemas nanoestruturados cineticamente estáveis compostos por uma fase oleosa e uma fase aquosa estabilizadas por surfactante, formando micelas de tamanho médio na ordem dos 100 nm (GUPTA et al., 2016)

(Figura 7). Esses nanossistemas, assim como os lipossomos, podem ser utilizados como carreadores de compostos hidrofóbicos, possibilitando a sua dispersão em meio aquoso por períodos maiores de tempo, e em sistemas vivos contribuem para uma liberação sustentada de fármacos lipofílicos, aumentando sua biodisponibilidade no organismo e diminuindo os efeitos colaterais em comparação aos fármacos livres (BALDISSERA *et al.*, 2013).



**Figura 7.** Esquema ilustrativo dos tipos de nanoemulsão. Em azul, está representada a fase aquosa, em marrom está representada a fase oleosa. Autoria própria.

Como evidências de efeitos promissores da nanoemulsificação de compostos com efeito antibacteriano, tem-se o trabalho de DONSI e colaboradores (2011) em que se constatou que a nanoencapsulação de óleos essenciais contendo misturas de terpenos e D-limoneno teve seu efeito antimicrobiano aumentado contra *Escherichia*

*coli*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae* (cepas não-especificadas), crescidas em sucos de frutas, em comparação com esses compostos livres. Em um outro estudo, realizado por BHARGAVA e colaboradores (2015), o óleo de orégano nanoemulsificado mostrou-se eficaz contra *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Salmonella Typhimurium* ATCC 19585 e *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 700927, comparado ao mesmo composto na forma livre.

ALENCAR *et al.* (2015) demonstraram que a atividade antimicrobiana do óleo de *Rana catesbeiana*, da oleorresina e do óleo essencial de *Copaifera langsdorffii* na forma de nanoemulsão foi maior do que a atividade desses óleos na forma livre nas concentrações testadas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Candida albicans* ATCC 90027, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 13803, e isolados clínicos dessas espécies.

KRISHNAMOORTHY e colaboradores (2018) demonstraram por vários métodos que suas nanoemulsões com óleo essencial da semente de *Cleome viscosa* foram eficazes contra *S. aureus* resistente à meticilina, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* resistentes a beta-lactâmicos, isolados de frangos estragados.

Esses estudos, dentre a crescente lista sobre este tema, exemplificam e corroboram com a hipótese de que a nanoemulsificação de óleos antimicrobianos aumentam a sua biodisponibilidade e eficácia, constituindo estratégias promissoras para o desenvolvimento de novos antibióticos. Adicionalmente, foi demonstrado por GAOE e colaboradores (2012), por exemplo, que a nanoemulsificação de compostos, como o docetaxel, pode diminuir a sua toxicidade aos tecidos saudáveis.

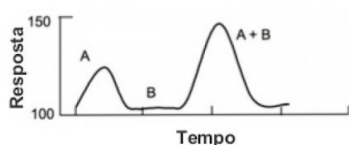
## **1.5. Terapia combinatória**

A terapia combinatória consiste na combinação de duas ou mais moléculas ou estratégias terapêuticas, visando o aumento da eficácia de um tratamento. Os

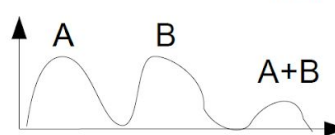
medicamentos podem interagir de três formas: sinergicamente, aditivamente ou antagonicamente.

De acordo com CHOU (2010), sinergia é um fenômeno físico-químico decorrente da Lei de Ação de Massas, no qual duas ou mais moléculas ou compostos atuam cooperativamente, resultando em um efeito maior do que o efeito esperado da sua adição. O antagonismo, por sua vez, seria o efeito oposto, no qual uma molécula anularia o efeito da outra. Já na adição, as atividades dos compostos quando juntos são independentes (**Figura 8**).

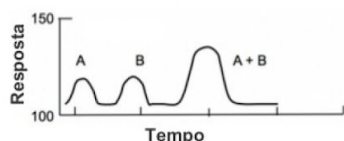
- **SINERGISMO:**  $E_{REAL} > E_{ESPERADO}$



- **ANTAGONISMO:**  $E_{REAL} < E_{ESPERADO}$



- **ADIÇÃO:**  $E_{REAL} = E_{ESPERADO}$



**Figura 8.** Tipos de efeitos decorrentes de terapias combinatórias. Legenda: E = efeito. A = droga “A”. B = droga “B”. Autoria própria.

Há diversas metodologias e modelos utilizados para se calcular e determinar a natureza sinérgica, antagônica ou aditiva de uma combinação (ROELL, REIF & MOTSINGER-REIF, 2017), a citar: Aditividade de Loewe, Independência de Bliss, método do isoblograma e método de Chou-Talalay.

Nesta pesquisa, foi escolhido o método de Chou-Talalay por ser amplamente aceito (ROELL, REIF & MOTSINGER-REIF, 2017). De acordo com este modelo, para se determinar matematicamente a natureza da interação, é proposto que se calcule o *índice de combinação* (CI, do inglês, *combination index*), calculado pela equação:

$$CI = \left(\frac{Da}{Dma}\right) + \left(\frac{Db}{Dmb}\right)$$

Onde:

$Da$  = dose da droga “a”

$Dma$  = dose de efeito mediano (=  $IC_{50}$ ) da droga “a”

$Db$  = dose da droga “b”

$Dmb$  = Dose de efeito mediano da droga “b”

Quando  $CI > 1$ , a combinação de a + b é de natureza *antagônica*; se  $CI = 1$ , a combinação é *aditiva*; e quando  $CI < 1$ , a natureza da combinação é *sinérgica* (**Figura 8**).

Desse modo, pode-se utilizar modelos computacionais, como o programa *CompuSyn*<sup>®</sup>, para determinar a natureza da combinação entre dois ou mais compostos estudados, fornecendo dados de dose-resposta obtidos experimentalmente.

HWANG e colaboradores (2013) demonstraram a atividade sinérgica do peptídeo antimicrobiano coprisina quando combinado aos antibióticos ampicilina, vancomicina e cloranfenicol, administrados *in vitro* contra *Enterococcus faecium* (ATCC 19434), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* O-157 (ATCC 43895), *E. coli* (ATCC 25922), e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Outro trabalho conduzido por CHUNG, NAVARATNAM & CHUNG (2011) revelou sinergismo entre os triterpenóides pentacíclicos alfa-amirina, ácido betulínico e betulinaldeído, e vancomicina ou metilicina contra cepas de *S. aureus* suscetível (ATCC 29213) e resistente (ATCC 43300).

Os benefícios da terapia combinatória frente às monoterapias seriam o aumento da eficácia, a diminuição da toxicidade (pelo fato de se utilizar concentrações menores do que as concentrações utilizadas na monoterapia) e diminuição do desenvolvimento de resistência a fármacos (FOUCQUIER & GUEDJ, 2015).

Por fim, levando em conta o cenário atual de crescente surgimento de cepas resistentes a antimicrobianos, com enfoque na bactéria *S. aureus*, que é responsável

por diversas infecções oportunistas, é de interesse científico e médico investigar e elaborar novas e mais eficazes estratégias terapêuticas antimicrobianas. Foram explicitadas anteriormente, com base em estudos prévios, os potenciais antimicrobianos da oleorresina de copaíba e do ácido anacárdico, além das vantagens da nanotecnologia e da nanoemulsificação de óleos com potencial terapêutico. Adicionalmente, a terapia combinatória tem sido estudada como uma estratégia para contornar a resistência a antimicrobianos. Entretanto, até onde se sabe, nenhum estudo foi conduzido previamente acerca da combinação entre nanoemulsão à base da oleorresina de copaíba (*Copaifera officinalis*) e o ácido anacárdico C<sub>15:0</sub> (também denominado ácido 6-pentadecil salicílico), podendo ser uma interessante estratégia a ser estudada.



## 2. JUSTIFICATIVA

Na busca de novas alternativas eficazes, seguras (tanto para a saúde humana e animal, quanto para o ecossistema) para o tratamento de enfermidades causadas por agentes etiológicos bacterianos, que vêm desenvolvendo progressivamente resistência aos antibióticos convencionais, este estudo visa concatenar os conhecimentos a respeito do potencial antimicrobiano da oleorresina de copaíba e do ácido anacárdico, das vantagens da nanoemulsificação de compostos antimicrobianos e das vantagens da terapia combinatória para avaliar o potencial antimicrobiano da combinação entre o ácido anacárdico (C<sub>15:0</sub>) e a nanoemulsão de copaíba contra *Staphylococcus aureus*.

A oleorresina de copaíba já é amplamente conhecida na etnofarmacologia por suas propriedades antiinflamatórias e antimicrobianas, ressaltando a valorização das espécies presentes na biodiversidade brasileira e da sua exploração sustentável, além do reconhecimento dos saberes tradicionais e da importância da investigação sistemática de outras propriedades farmacológicas de compostos naturais e das suas limitações (por exemplo, toxicidade).

Por sua vez, o ácido anacárdico também apresenta atividade antimicrobiana previamente relatada na literatura, podendo apresentar diversos mecanismos de ação como a inativação enzimática da NADH oxidase e desestabilização de membrana.

Combinar as vantagens da nanoemulsificação do óleo de copaíba, como o aumento da biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos presentes na oleorresina de copaíba, liberação sustentada desses compostos e aumento da eficácia antimicrobiana, com as propriedades do ácido anacárdico pode apresentar uma atividade antimicrobiana maior do que a administração isolada desses compostos.

Para testar esta hipótese, foram utilizadas quatro abordagens experimentais: ensaio metabólico com resazurina associada ao ensaio de microdiluição em caldo, semeadura em ágar para contagem de colônias, citometria de fluxo e microscopia eletrônica de varredura. Além disso, o modelo de Chou-Talalay foi utilizado para determinar a natureza sinérgica, antagônica ou aditiva das combinações. Por fim, a

espécie *Staphylococcus aureus* foi escolhida como modelo de bactéria Gram-positiva por ser uma das espécies de relevância clínica mais estudadas e caracterizadas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana da nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (*Copaifera officinalis*) e da sua combinação com o ácido anacárdico (C<sub>15:0</sub>) livre, em cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Padronizar o protocolo para a formulação da nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (NE);
- Caracterizar a NE com base nos parâmetros físico-químicos diâmetro hidrodinâmico, potencial Zeta, índice de polidispersão e potencial hidrogeniônico;
- Avaliar a estabilidade coloidal da NE ao longo do tempo;
- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* da NE, da formulação sem óleo (B) e da oleorresina livre (OL);
- Avaliar o efeito das combinações da NE e de seus componentes individuais com o ácido anacárdico (AA) no metabolismo, viabilidade, integridade de membrana e morfologia da cultura de *S. aureus* 25923.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Formulação das nanoemulsões

O óleo de copaíba foi adquirido pela empresa brasileira FERQUIMA, e foi extraído diretamente do tronco da árvore da espécie *Copaifera officinalis* (Ferquima, 2018).

O surfactante escolhido para a formulação das nanoemulsões foi a lecitina de ovo (LIPOID E 80™), pois é um surfactante advindo de fonte natural, considerado como seguro pela agência estadunidense *Food and Drug Administration* (ver *Food Additive Status List* na seção **Referências**). A lecitina de ovo utilizada é composta majoritariamente pelo fosfolípido fosfatidilcolina (80%).

O método de formulação das nanoemulsões foi baseado no trabalho de ARAÚJO (2016), com modificações. Ao longo dessa pesquisa, foram formulados dois tipos de nanoemulsões, que se diferenciam pela proporção (m/m) de surfactante : óleo, sendo elas a NE 1:1 (90 g de lecitina para 90 g de óleo) e NE 2:1 (180 g de lecitina para 90 g de óleo).

Primeiramente, as massas do surfactante e do óleo foram medidas respeitando a proporção estabelecida para cada nanoemulsão. Em seguida, 5 mL de água deionizada foram acrescentados para formar as nanoemulsões NE 1:1 e NE 2:1, que foram imediatamente submetidas à ultra-sonicação em banho de gelo (Vibra-Cell™, Sonics & Materials Inc., USA).

Todo o processo de preparo e armazenamento das formulações se deu sob abrigo da luz para evitar a oxidação dos seus componentes, e após a formulação, elas foram armazenadas a 4 °C.

Ao final do preparo, as nanoemulsões NE 1:1 e NE 2:1 apresentaram uma concentração de óleo de copaíba igual a 18 mg/mL.

De modo a averiguar se os veículos das nanoemulsões exerceram alguma atividade antimicrobiana, foram formulados os brancos (B 1:1 e B 2:1) contendo apenas

o surfactante e a água, nas mesmas proporções que as suas respectivas nanoemulsões.

Para comparar a atividade das nanoemulsões com a atividade dos óleos em sua forma livre (ou seja, não-emulsificados), os óleos foram diluídos em etanol P.A., ou em DMSO (no ensaio de *screening* dos óleos), e em seguida dispersos em água deionizada para chegar à mesma concentração que a nanoemulsão. Nesta última diluição, a concentração de etanol atingiu 2,8% (v/v) e a concentração de DMSO foi menor ou igual a 4% (v/v), concentração baixa o suficiente para não inibir a proliferação bacteriana.

#### **4.2. Caracterização das nanoemulsões**

Para caracterizar as nanoemulsões pelos parâmetros de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (IDP) e potencial Zeta (PZ), elas foram previamente diluídas na proporção de 1:10 e analisadas no equipamento ZetaSizer Nano ZS® (Malvern Instruments, Reino Unido) pela técnica de espectroscopia de foto-correlação, também conhecida como espalhamento de luz dinâmico (em inglês, *Dynamic Light Scattering, DLS*), e por mobilidade eletroforética.

#### **4.3. Ácido anacárdico**

O ácido anacárdico (ácido 6-pentadecil-salicílico), pureza igual a 96,69%, com cadeia alquílica saturada (C<sub>15:0</sub>) foi sintetizado e gentilmente concedido pelo Prof. Dr. Luiz Romeiro. A produção da solução estoque de ácido anacárdico foi feita pela solubilização em DMSO, atingindo a concentração de 1250 µg/mL.

#### **4.4. Testes biológicos *in vitro***

##### **4.4.1. Linhagem celular**

Foi utilizado como modelo biológico nos ensaios antibacterianos a cepa *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923, disponibilizado pela Profa. Dra. Mariana de Souza Castro. Esta cepa é suscetível a antibióticos (metecilina, vancomicina, penicilina, quinolonas), é do tipo Gram-positiva, possui metabolismo aeróbio facultativo, produz lecitinase e cresce em meios complexos, como caldo tríptico de soja e caldo Mueller-Hinton.

##### **4.4.2. Microdiluição em caldo**

As suspensões bacterianas de *S. aureus* (ATCC 25923) crescidas de um dia para o outro em caldo Mueller-Hinton (MH) tiveram sua turbidez ajustada para a densidade óptica de 1,00. Em seguida, esses inóculos foram diluídos em caldo MH na proporção de 1:1000 (equivalente a  $10^5$  UFC/mL). Primeiramente, foram feitas as diluições seriadas das nanoemulsões, dos brancos, do óleo livre, do DMSO e do ácido anacárdico. Em seguida, foram adicionados 50  $\mu$ L de suspensão de *S. aureus* na concentração de  $10^5$  UFC/mL em cada poço, resultando no volume final de 100  $\mu$ L por poço. As concentrações finais de óleo contidas nas nanoemulsões em cada poço variaram entre 0.09 e 9.00 mg/mL. Para o DMSO e o AA, foram obtidas as concentrações 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5  $\mu$ g/mL. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa bacteriológica. Após incubação, foram adicionados 10  $\mu$ L de resazurina em cada poço, e as placas foram incubadas novamente por mais 30 minutos. A intensidade de fluorescência de cada poço foi obtida por uma leitora (FlexStation® 3, Molecular Devices, San Jose, Califórnia, EUA) nos comprimentos de onda  $\lambda_{\text{excitação}} = 575$  nm e  $\lambda_{\text{emissão}} = 595$  nm.

#### **4.4.3. Semeadura sobre ágar para contagem de colônias**

Após o ensaio de microdiluição em caldo, uma amostra de 10 µL de cada tratamento foi diluída 10.000 vezes em caldo MH e, em seguida, 10 µL foram gotejados sobre ágar Muller-Hinton e espalhados sobre toda a sua superfície com uma alça de Drigalski, até todo o líquido secar. As placas foram seladas com filme de plástico e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após a incubação, comparou-se o número de colônias presentes sobre as placas entre os diferentes grupos.

#### **4.4.4. Citometria de fluxo**

Das placas contendo as bactérias previamente submetidas aos tratamentos, foram retirados 100 µL de cada poço e transferidos para seus respectivos microtubos, nos quais foram adicionados 900 µL de PBS 1x em cada. 5 minutos antes da aferição de cada microtubo pelo citômetro BD FACSVerser™ (Becton, Dickinson & Company, New Jersey, EUA), foram adicionados 32 µL de iodeto de propídio ao tubo a ser analisado, submetido a agitação antes e depois da incubação com este marcador, à temperatura ambiente e protegido da luz.

#### **4.4.5. Microscopia eletrônica de varredura**

100 µL dos poços contendo bactérias previamente submetidas aos tratamentos e os controles foram centrifugados e lavados três vezes com tampão PBS 1x, a 5000 x g por 5 minutos. Após a última centrifugação, retirou-se o sobrenadante e diluiu-se o *pellet* com fixador Karnovsky 0,1 M, deixando a suspensão celular ser fixada de um dia para o outro (não mais do que 24 horas). Após a fixação, centrifugou-se e lavou-se duas vezes as suspensões bacterianas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Em seguida, lamínulas cobertas com poli-L-lisina foram depositadas no fundo de 9 poços

de placas de 24 poços, e sobre as lamínulas foram depositadas as respectivas suspensões bacterianas, para que as células pudessem aderir às lamínulas. Após 5 minutos, as células aderiram às lamínulas, e então, estas foram submetidas a molhos de 10 minutos em soluções de 50%, 70%, 90% e duas vezes de 100% de acetona, seguido de desidratação completa por ponto-crítico de dióxido de carbono. Por fim, as lamínulas foram metalizadas com partículas de ouro e platina, e analisadas no microscópio eletrônico de varredura (JSM-7000F, Jeol, Tóquio, Japão).

#### **4.5. Testes estatísticos**

Todos os ensaios foram realizados em no mínimo duplicata, e repetidos no mínimo duas vezes, exceto a microscopia eletrônica de varredura.

Em todos os ensaios, foi utilizado o teste estatístico ANOVA, com pós-teste de Tukey. Foi adotado o valor de  $p < 0,05$  para significância estatística. Foi utilizado o programa *GraphPad Prism 6™* para as análises estatísticas e construção de gráficos.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização e análise de estabilidade das nanoemulsões da oleorresina de copaíba

#### 5.1.1. Caracterização

A fim de determinar as características físico-químicas das nanoemulsões à base de oleorresina de copaíba (NE) utilizadas neste trabalho, foram obtidos dados acerca do diâmetro hidrodinâmico (DH), do índice de polidispersão (IPD), do potencial Zeta (PZ) e do potencial hidrogeniônico (pH) das formulações. A **tabela 2** mostra os resultados dessas características físico-químicas da nanoemulsão concentrada com proporção surfactante : óleo de 1:1 (NE 1:1 – m/m) ou 2:1 (NE 2:1), e dos seus respectivos brancos (denominados B 1:1 e B 2:1, sem óleo).

**Tabela 2.** Características físico-químicas das nanoemulsões da oleorresina de copaíba, NE 1:1 e NE 2:1, e seus respectivos brancos, B 1:1 e B 2:1, com 1 dia de formulação.

Formulação (surfact. : óleo, m/m)	DH (nm)	IPD	PZ (mV)	pH
NE 1:1	171,7 ± 3,3	0,372 ± 0,073	-36,8 ± 0,6	6
B 1:1	144,8 ± 1,2	0,288 ± 0,035	-28,0 ± 1,0	7
NE 2:1	151,0 ± 2,5	0,469 ± 0,014	-29,6 ± 0,6	6
B 2:1	264,1 ± 4,3	0,425 ± 0,023	-20,8 ± 0,6	7

DH = diâmetro hidrodinâmico; IPD = índice de polidispersão; PZ = potencial Zeta; pH = potencial hidrogeniônico.

Os resultados obtidos evidenciam que a nanoemulsão apresentou diâmetro hidrodinâmico médio inferior a 200 nm. De acordo com Anton & Vandamme (2011), nanoemulsões são sistemas que apresentam gotículas cujo diâmetro é inferior a 300

nm. Mason *et al.* (2006) e McClements (2012), por sua vez, sugerem que nanoemulsões devam apresentar raio médio inferior a 100 nm, ou seja, um diâmetro médio inferior a 200 nm. Gupta e colaboradores (2016) apresenta uma proposta mais flexível de nanoemulsão, sendo definida como um sistema coloidal cujas gotículas apresentem diâmetro na ordem de  $10^2$  nm. Considerando tais definições e que o diâmetro hidrodinâmico contabiliza a camada de solvatação ao redor das micelas, revelando um diâmetro maior do que o diâmetro real das micelas, a formulação de oleorresina de copaíba utilizada no presente trabalho encaixa-se no conceito de nanoemulsão. Entretanto, para constatar o tamanho real das nanogotículas, é preciso submetê-las à microscopia eletrônica de transmissão.

O índice de polidispersão (IPD), por sua vez, mostra a distribuição de tamanho das partículas, dentro de uma amostra. Os valores que expressam o índice de polidispersão variam entre 0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 0, mais *monodisperso* é o sistema, sendo composto por gotículas de tamanho muito similar, enquanto que quanto mais os valores se aproximam de 1, mais *polidisperso* é o sistema, maior é a distribuição “populacional” de peso molecular das gotículas que o compõem, se diversificando muito em termos de tamanho (Rane & Choi, 2005). A polidispersão pode impactar na estabilidade das nanoemulsões, de modo que quanto maior a polidispersão, maior a taxa de maturação de Ostwald - fenômeno no qual gotículas menores se fundem a gotículas maiores (TADROS *et al.*, 2004). No caso da nanoemulsão NE 1:1, o IPD encontra-se próximo de 0,300 (Tabela 2), e de acordo com Bhattacharjee (2016), IPD entre 0,1 e 0,4 sugere um sistema moderadamente polidisperso. Entretanto, outros autores (He *et al.*, 2011; Eid, Elmarzugi & El-Enshasy, 2013; Esquerdo, Dotto & Pinto, 2015) consideram monodispersos IPDs até 0,3.

Rodrigues e colaboradores (2014) produziram uma nanoemulsão similar, porém com o surfactante polissorbato 80 no lugar da lecitina e utilizando o método de temperatura de inversão de fase seguida de homogeneização mecânica, e obtiveram DH médio em torno de 150 nm e IPD em torno de 0,3. Lima (2016) produziu nanoemulsões à base de óleo de copaíba com diferentes proporções do surfactante

Cremophor EL, nas quais incorporou o alcalóide epiisopiloturina, demonstrando que as diferentes razões de óleo : surfactante geram nanoemulsões com diferentes tamanhos de nanogotículas e diferentes valores IPD, sendo que para a proporção de 1:1, como no caso do presente estudo, o DH obtido foi de cerca de 190 nm e o IPD foi de aproximadamente 0,4.

Por sua vez, o potencial Zeta é definido como a diferença de potencial entre a dupla camada elétrica ao redor das gotículas e o meio dispersante (BHATTACHARJEE, 2016). Vale ressaltar que o valor do potencial Zeta não diz respeito à carga da superfície das gotículas (determinada pelo potencial de Nernst). Deste modo, considerando um mesmo meio dispersante, quanto maior for o módulo do potencial Zeta, mais cargas de uma mesma natureza - positiva ou negativa - estarão presentes na dupla camada elétrica ao redor das gotículas, e desta forma, maior será a repulsão eletrostática entre as gotículas de uma nanoemulsão. Embora o potencial Zeta não seja o único fator que atue na estabilidade coloidal de uma nanoemulsão, ele contribui para isso, e de modo geral, um potencial Zeta com módulo elevado (acima de 30 mV) é geralmente associado a uma expressiva estabilidade coloidal (BHATTACHARJEE, 2016). No caso da NE 1:1, seu potencial Zeta atingiu -35 mV (**Tabela 2**), o que pode contribuir para a estabilidade coloidal da nanoemulsão.

Por último, o pH da nanoemulsão NE 1:1 encontra-se em torno de 6 (**Tabela 2**), relativamente ácido. Isso é esperado devido à presença de terpenos ácidos na composição da oleorresina de copaíba, como o ácido hardwickiico (**Figura 3G**) e o ácido copálico (**Figura 3F**). É descrito em alguns trabalhos (KONG & PARK, 2011; BHATTACHARJEE, 2016) a influência do pH da nanoemulsão sobre o seu potencial Zeta. Por exemplo, os grupos carboxílicos presentes em ácidos orgânicos podem colaborar para um potencial Zeta de caráter negativo (Hanaor et al, 2012), explicando neste caso o aumento no módulo do potencial Zeta da NE 1:1 quando comparado com o B 1:1 que não contém oleorresina de copaíba.

Todas as características físico-químicas descritas neste tópico dão indícios da estabilidade coloidal da nanoemulsão. A manutenção da estabilidade de nanoemulsões

é visada para que estas mantenham as propriedades da escala nanométrica e sua biodisponibilidade, evitando a formação de agregados e a liberação precoce dos componentes nanoencapsulados.

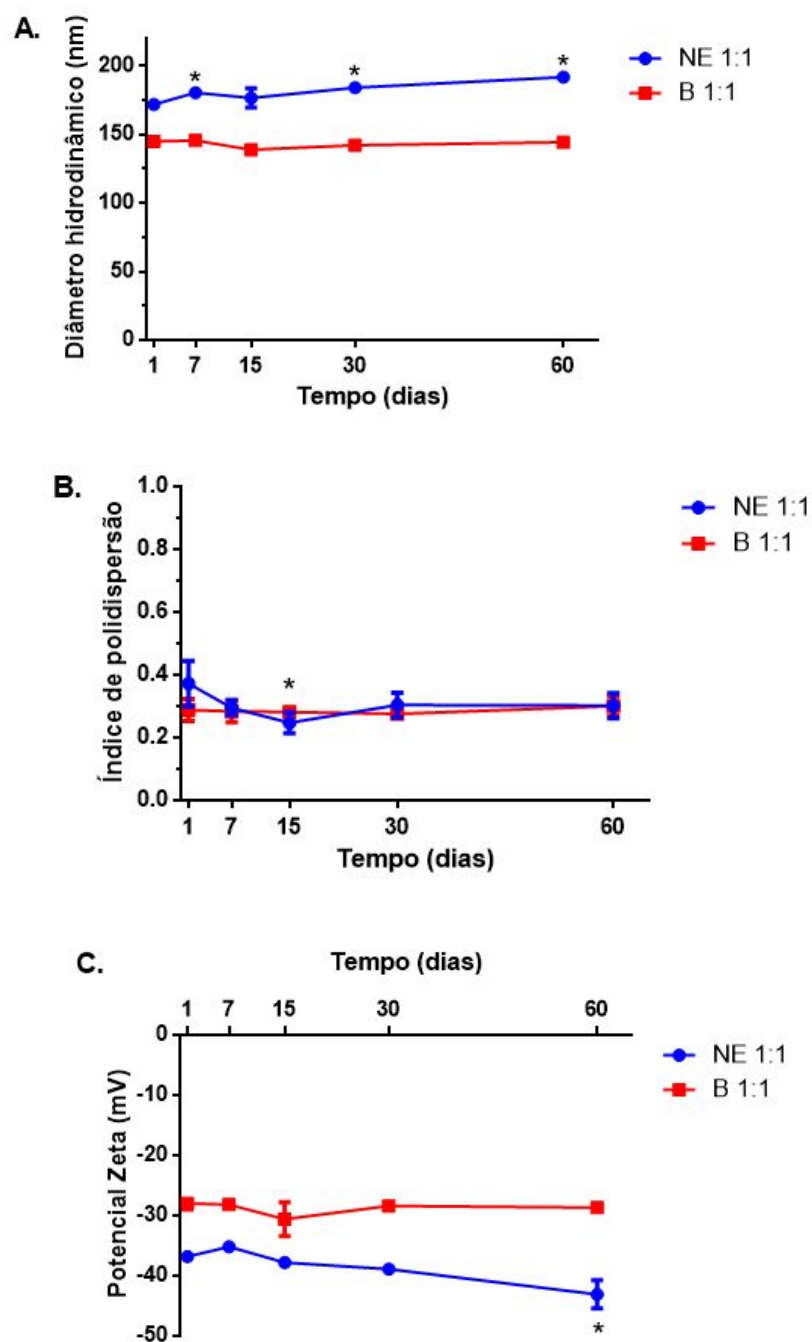
### 5.1.2. Estabilidade ao longo do tempo

A seguir, na **Figura 9**, estão ilustrados os gráficos de estabilidade da nanoemulsão de copaíba NE 1:1 e seu respectivo branco, B 1:1, ao longo de 60 dias, partindo do primeiro dia após a sua formulação. Apenas estes dois grupos foram avaliados porque eles foram os escolhidos para sua avaliação antimicrobiana na maioria dos testes biológicos realizados posteriormente neste trabalho.

A nanoemulsão NE 1:1 apresentou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do diâmetro hidrodinâmico em cerca de 20 nm ao longo de 60 dias, devido ao fenômeno de maturação de Ostwald, que ocorre naturalmente neste tipo de sistema nanoestruturado. Tal variação não foi substancial para a desestabilização da amostra, visto que, macroscopicamente, as duas formulações não apresentaram sinais de cremagem, floculação ou separação de fase (dados não apresentados).

Durante o tempo de acompanhamento da estabilidade das formulações, tanto a NE 1:1 quanto o B 1:1 apresentaram IPD em torno de 0,300, indicando estabilidade.

Em termos de potencial Zeta, este variou pouco na formulação B 1:1, porém aumentou gradualmente em módulo, cerca de 10 mV, durante os 60 dias de avaliação na formulação NE 1:1. Esta variação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) acredita-se ser devido à ionização dos compostos presentes na oleorresina, como os diterpenos ácidos.



**Figura 9.** Estabilidade coloidal da nanoemulsão de oleorresina de copaíba NE 1:1 e seu respectivo branco B 1:1, armazenados a 4°C e protegidos da luz, analisada pelos parâmetros: (A) diâmetro hidrodinâmico, (B) índice de polidispersão e (C) potencial Zeta ao longo do tempo. Os asteriscos representam diferença significativa em relação aos valores do primeiro dia de formulação.

Porteglio de Lima (2017) formulou uma nanoemulsão à base de óleo de copaíba (*C. reticulata*) com o surfactante Tween® 80 e observou a sua estabilidade ao longo de 30 dias, mantendo a nanoemulsão à temperatura ambiente. No primeiro dia, a nanoemulsão apresentou DH, IPD e PZ iguais a  $270,2 \text{ nm} \pm 11,0 \text{ nm}$ ,  $0,247 \pm 0,025$  e  $-30,00 \text{ mV}$ , respectivamente, enquanto no trigésimo dia esses valores foram  $302,93 \text{ nm} \pm 2,46 \text{ nm}$ ,  $0,271 \pm 0,016$  e  $-31,33 \text{ mV}$ . Portanto, houve um aumento em módulo de todos esses três parâmetros ao longo do tempo, assim como no presente trabalho, embora no presente trabalho tenha havido uma variação menor de diâmetro hidrodinâmico e uma variação maior do potencial Zeta. Essa variação pode ser dependente dos componentes da formulação, das condições de armazenamento e do método de formulação, por exemplo. Araújo (2017) e Sampaio (2017) observaram que suas nanoemulsões à base de óleo de açaí e de óleo de buriti, respectivamente, apresentaram maior estabilidade ao longo do tempo à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  do que à temperatura ambiente.

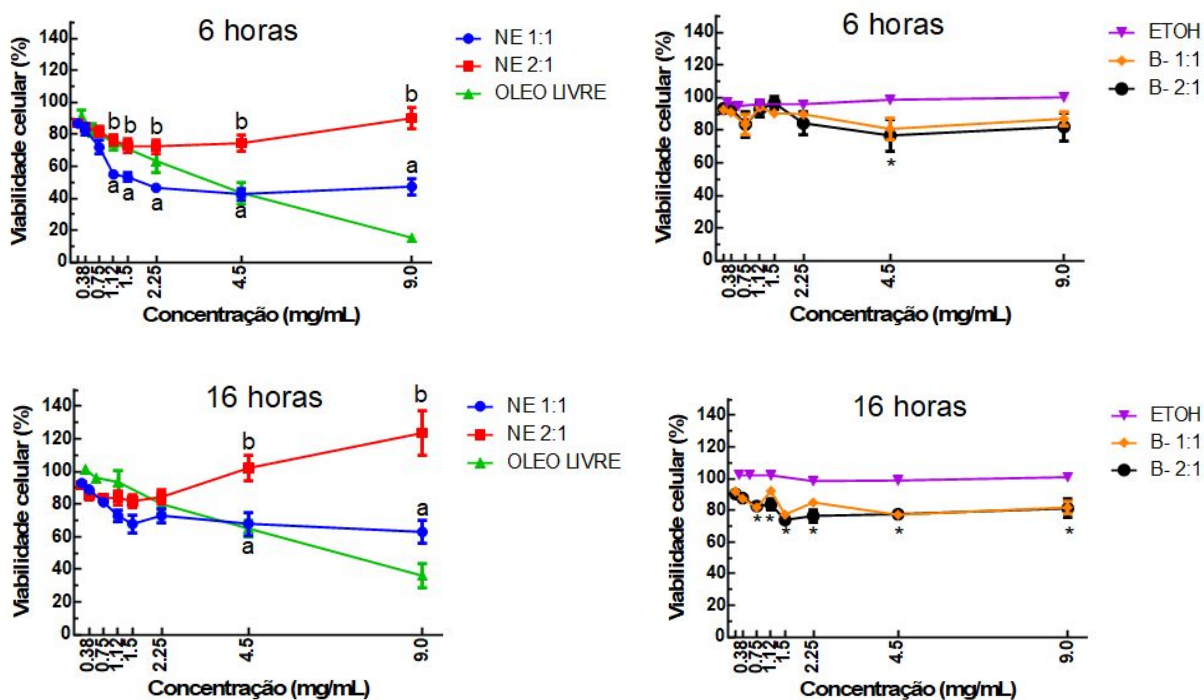
Após a caracterização e determinação da estabilidade, a atividade antimicrobiana da nanoemulsão foi avaliada.

## **5.2. Testes biológicos**

### **5.2.1. Teste da influência da proporção de surfactante (lecitina) sobre o efeito antimicrobiano da nanoemulsão à base de óleo de copaíba**

A fim de se analisar a influência da quantidade de surfactante da nanoemulsão sobre a sua atividade antimicrobiana, foram avaliadas duas nanoemulsões: a NE 1:1 com proporção 1:1 de surfactante : óleo (m/m); e a NE 2:1, com proporção 2:1 de surfactante : óleo (m/m). A **figura 10** ilustra os resultados da viabilidade bacteriana de *S. aureus* ATCC 25923 (inóculo inicial =  $10^5 \text{ UFC/ml}$ ) em função da concentração dos

tratamentos obtidos após 6 e 16 horas de exposição aos tratamentos e controles. Foi decidido utilizar os tempos de 6 e 16 horas visto que foi constatado ao longo do trabalho que os tempos de 24 e 48 horas poderiam ser tempos muito longos para observar o efeito dos tratamentos, devido à rápida taxa de proliferação da cepa utilizada. Outro motivo que justifique o estabelecimento dos tempos de 6 e 16 horas é devido à logística experimental. Não foram encontrados outros trabalhos que avaliassem a atividade antimicrobiana com estes mesmos tempos experimentais.



**Figura 10.** Viabilidade celular de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 após (A) 6 horas e (B) 16 horas de exposição aos tratamentos: nanoemulsão de copaíba com a proporção (m/m) surfactante : óleo 1:1 (NE 1:1), nanoemulsão de copaíba com a proporção surfactante : óleo 2:1 (NE 2:1), óleo de copaíba livre (OLEO LIVRE), controle de etanol correspondente ao veículo do óleo livre (ETOH), formulação sem óleo com concentração de surfactante igual à da nanoemulsão 1:1 (B- 1:1), formulação sem óleo com concentração de surfactante igual à da nanoemulsão 2:1 (B- 2:1). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão. Legenda: letras diferentes = diferença

significativa ( $p < 0,05$ ) entre grupos. Asterisco: diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo.

Os resultados evidenciam uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre a atividade antimicrobiana das nanoemulsões NE 1:1 e NE 2:1 nas três maiores concentrações no tempo de 6 horas, enquanto que no tempo de 16 horas elas diferiram estatisticamente ( $p < 0,001$ ) nas concentrações de 4,50 mg/mL e 9,00 mg/mL, sugerindo que a quantidade de surfactante de alguma forma influencia na atividade do óleo nanoencapsulado, de modo que a nanoemulsão com menor quantidade de surfactante (NE 1:1) reduziu até 42,8% a mais do que a nanoemulsão NE 2:1.

Além disso, a nanoemulsão NE 1:1 se mostrou mais eficaz do que a oleorresina livre até a sexta concentração (2,25 mg/mL), inibindo até 19,74% e 20,72% a mais na concentração 1,12 mg/mL nos tempos de 6 horas e 16 horas, respectivamente.

O mecanismo de interação da nanoemulsão com a célula bacteriana permanece desconhecido, embora haja três possibilidades: a de internalização das nanogotículas pelas células, a de adesão da nanogotícula à parede celular, ou a de liberação do conteúdo da nanogotícula na vizinhança da célula. DRULIS-KAWA *et al.* (2009) demonstraram o mecanismo de internalização de lipossomos (DH = 105-110 nm) catiônicos encapsulando o fluoróforo rodamina em várias cepas de *P. aeruginosa*, constatando a fusão do lipossomo à membrana plasmática em algumas cepas ou aderência do lipossomos à superfície de outras cepas, e demonstrou que proteínas presentes na membrana de algumas cepas são as responsáveis pela adesão e internalização dos lipossomos. Outra possibilidade no caso de testes como cepas produtoras de lecitinase, como o *S. aureus* ATCC 25923, utilizado no presente trabalho, hipotetiza-se que seja a liberação do conteúdo da nanoemulsão à base de lecitina na vizinhança das células, devido à sua degradação por tal enzima antes de sua internalização.

Não obstante, o óleo livre apresentou atividade antimicrobiana igual ou maior do que a NE 1:1 nas duas últimas concentrações. Diversos estudos já demonstraram a



atividade antimicrobiana de oleorresinas e óleos essenciais de espécies do gênero *Copaifera* contra várias linhagens bacterianas (DIEFENBACH, 2017; SANTOS, 2008). Diterpenos e sesquiterpenos são os componentes majoritários das oleorresinas de árvores pertencentes ao gênero *Copaifera*, sendo que no caso da oleorresina da espécie *C. officinalis*, utilizada neste trabalho, os componentes predominantes são os diterpenos ácido hardwickiico (30,7%) e ácido copálico (13,9%), e o sesquiterpeno beta-cariofileno (8,5%), de acordo com SANTOS e colaboradores (2008). Pieri e colaboradores (2012) constataram a atividade bacteriostática da solução de 10% de oleorresina de *C. officinalis* em cultura de *S. mutans* ATCC 25175, com concentração inibitória mínima de 0,78 µL/mL. Comparando as curvas de dose-resposta da **Figura 10**, enquanto o óleo livre apresenta uma taxa linear de inibição, a nanoemulsão NE 1:1 apresenta uma taxa exponencial, porém a partir um certo ponto (próximo à concentração de 2,25 mg/mL) a nanoemulsão atinge uma aparente saturação e estabiliza a sua atividade. É difícil afirmar com exatidão o motivo desse fenômeno com os dados apresentados, contudo cogita-se que o mecanismo de inibição do óleo e da nanoemulsão sejam diferentes. Uma hipótese levantada é de que as cargas elétricas que envolvem as gotículas da nanoemulsão possam interagir com o potencial transmembranar bacteriano e interferir no processo de respiração celular e funcionamento da ATP-sintase (Fischer & Gräber, 1999)

EL KADRI *et al.* (2017) conduziram uma pesquisa testando a atividade antimicrobiana de nanoemulsões de ácido caprílico com diferentes proporções do surfactante hidrofílico Tween 80® em cepas de cinco espécies bacterianas (*E. coli*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* and *P. aeruginosa*), e eles também constataram que a atividade antimicrobiana das nanoemulsões eram inversamente proporcionais à proporção de surfactante das formulações. A hipótese sugerida por eles para explicar esse fenômeno é que grandes quantidades de surfactante podem promover a formação de micelas multilamelares que atrapalham a atividade do composto encapsulado.

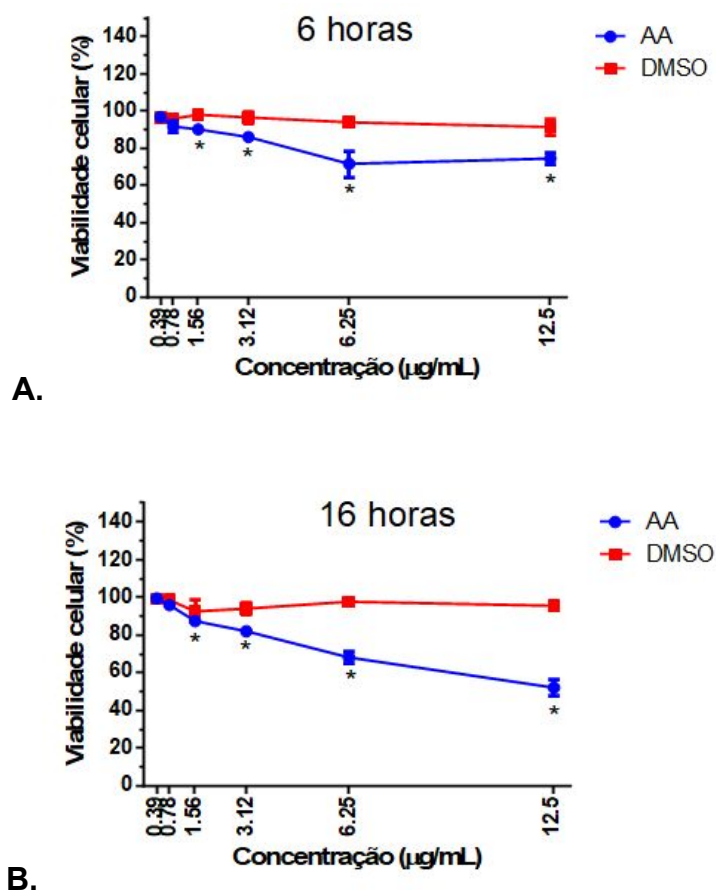
O surfactante utilizado no presente trabalho é composto majoritariamente por uma mistura de diversos fosfolipídios, tais como fosfatidilcolina (aproximadamente 80%), fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol (GENOT, KABRI & MEYNIER, 2013), extraídos de gema de ovos. De acordo com GENOT e colaboradores (2013), essas moléculas apresentam diferentes graus de afinidade com a água, e apresentam geometrias diferentes, podendo assim, dependendo da combinação de fosfolipídios, formar estruturas com diferentes formatos (lipossomos, bicamadas, poliedros...) e conferir potencial eletrostático diferente à superfície dessas estruturas. Não foi realizado durante o projeto um estudo para que se pudesse comprovar a formação de bicamadas multilamelares neste caso, porém a possibilidade de que isso tenha acontecido não é descartada.

Desse modo, os resultados obtidos corroboram com outros achados na literatura que sustentam que a quantidade do surfactante presente na formulação altera a atividade antimicrobiana da nanoemulsão. Portanto, é imprescindível para se formular uma nanoemulsão eficaz, encontrar uma proporção ideal entre surfactante e óleo para que se mantenha as propriedades farmacológicas dos compostos encapsulados e ao mesmo tempo se mantenha a estabilidade da nanoemulsão.

Alencar et al. (2015) testou uma nanoemulsão de oleoresina de *C. langsdorffii* contra *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 90027, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 13803, e isolados clínicos de cada espécie. A atividade antimicrobiana dessa nanoemulsão só foi constatada contra um isolado clínico de *S. epidermidis*, *C. glabrata* ATCC 2001 e um isolado clínico de *C. glabrata*, apresentando as respectivas concentrações inibitórias mínimas iguais a 0,0455 mg/mL, 0,9717 mg/mL e 0,0001 mg/mL.

### 5.2.2. Curva dose-resposta da atividade antibacteriana do ácido anacárdico

Uma vez logrado o objetivo de formular uma nanoemulsão à base de óleo de copaíba estável e com atividade antimicrobiana, o próximo objetivo foi testar a atividade do ácido anacárdico isoladamente, para se observar o perfil dose-resposta desta molécula. As **Figuras 11A e 11B** apresentam os resultados da curva dose-resposta do ácido anacárdico C15:0 (AA) e do seu veículo dimetilsulfóxido (DMSO) nos tempos de 6 e 16 horas de exposição, respectivamente. A concentração final de DMSO no meio após a solubilização não ultrapassou 1% em todas as diluições. As concentrações de ácido anacárdico testadas variaram entre 0,39 e 12,5 µg/mL.



**Figura 11.** Viabilidade celular de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 após (A) 6 horas e (B) 16 horas de tratamento com ácido anacárdico (AA) e o seu veículo dimetilsulfóxido (DMSO). Os dados estão apresentados como média ± erro padrão.

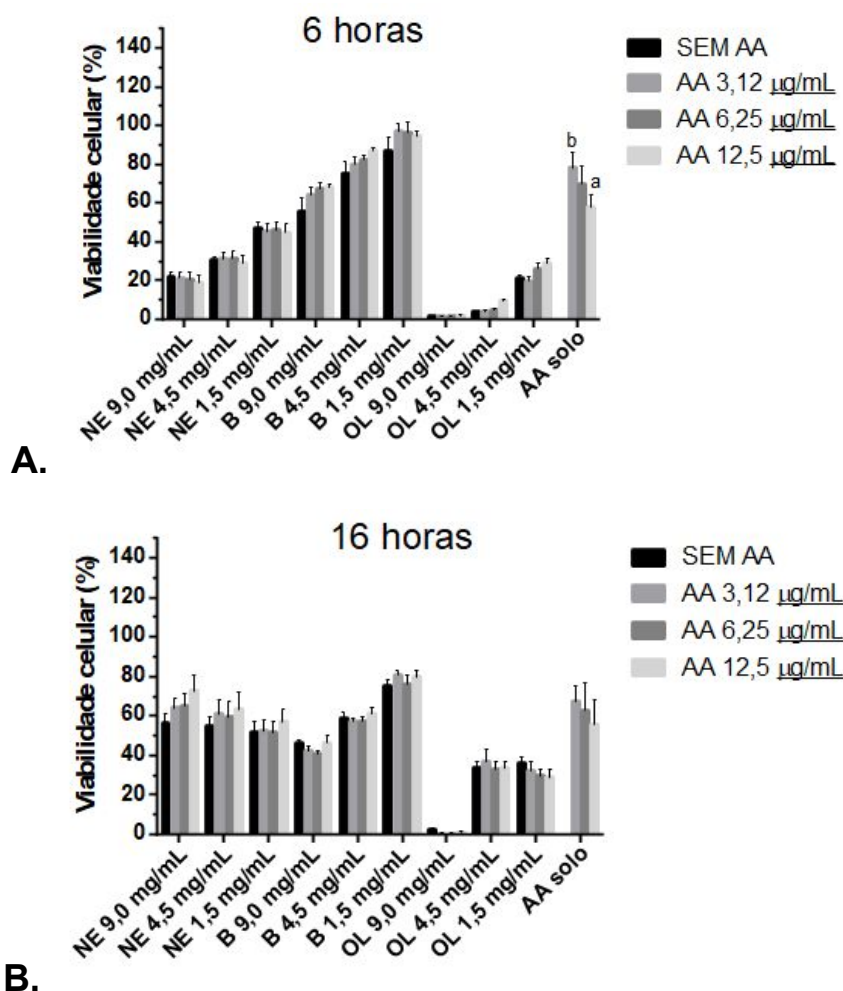
O ácido anacárdico apresentou uma atividade antibacteriana significativa ( $p < 0,05$ ) em comparação com o controle a partir da concentração de 1,56  $\mu\text{g/mL}$  nos tempos de 6 horas e 16 horas, ou seja, sua atividade contra *S. aureus* foi dose- e tempo-dependente, sendo que no tempo de 16 horas e na concentração de 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , a viabilidade das células bacterianas diminuiu cerca de 50%. O DMSO, por sua vez, não demonstrou toxicidade significativa ( $p > 0,05$ ) nas concentrações testadas.

Diversos estudos já demonstraram a eficácia antimicrobiana dos ácidos anacárdicos. KUBO, NIHEI & TSUJIMOTO (2003) testaram a atividade antibacteriana de dez variedades de ácido anacárdico contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 33591 (resistente à metilicina), *S. aureus* ATCC 33592 (resistente à gentamicina e metilicina), *S. aureus* ATCC 11632 (resistente à penicilina), *S. aureus* ATCC 29247, *Micrococcus luteus* ATCC 4698 e *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3080. Todas as cepas de *S. aureus* testadas apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) variando entre 1,56 e 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , variando com a cepa e com o tipo de ácido anacárdico (C15:3 ou C12:0). Com base em evidências apresentadas pelos autores, é sugerido que o ácido anacárdico pode interferir na cadeia transportadora de elétrons e na respiração aeróbica, impedindo a oxidação do NADH em *Micrococcus luteus*. Por sua vez, Rivero-Cruz et al. (2011) relataram a atividade antimicrobiana do ácido anacárdico C<sub>15:0</sub> contra *Streptococcus mutans* e *Porphyromonas gingivalis*, apresentando CIM igual a 104  $\mu\text{g/mL}$  e 126  $\mu\text{g/mL}$ , para as respectivas espécies. Bouttier et al. (2002) obtiveram uma CIM do ácido anacárdico saturado igual a 2,5 mg/mL para duas cepas de *S. aureus*: CIP 5816 e CIP 6811.

### 5.2.3. Ensaio de combinação da nanoemulsão e do óleo de copaíba livre com o ácido anacárdico

#### 5.2.3.1. Teste de microdiluição em caldo, com resazurina

Uma vez que a nanoemulsão, seu respectivo branco, o óleo de copaíba livre e o ácido anacárdico foram testados isoladamente, foi estabelecido o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana da combinação destes três primeiros elementos com o quarto elemento, para averiguar se há uma potencialização dos efeitos das partes. Os resultados encontram-se na **Figura 12**.



**Figura 12.** Viabilidade celular de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 após (A) 6 e (B) 16 horas de tratamento com três concentrações (1,5, 4,5 ou 9,0 mg/mL) de nanoemulsão de óleo de copaíba (NE 1:1), formulação sem óleo de copaíba (B 1:1) e

óleo de copaíba livre (OL) isolados ou combinados com o ácido anacárdico em três diferentes concentrações (3,12, 6,25 ou 12,5 µg/mL). Os dados estão apresentados como média ± erro padrão. Legenda: letras diferentes = diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Os ensaios de microdiluição revelados com resazurina indicaram que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as médias dos grupos sugerindo ausência de efeito combinatório entre NE ou óleo de copaíba livre com o AA. Porém, segundo o Chou (2010), o sinergismo não é um fenômeno calculado estatisticamente, mas sim pelo valor do índice de combinação (CI). De acordo com o modelo matemático de Chou-Talalay, utilizado pelo *software* CompuSyn®, houve sinergia, adição ou antagonismo, dependendo das doses combinadas e do tempo de exposição, para combinação NE+AA (**Tabelas 3 e 4**).

**Tabela 3.** Valores dos índices de combinação (CI) para cada combinação entre NE/B/OL e AA, com 6 horas de tratamento. CI < 1: sinergismo; CI = 1: adição; CI > 1: antagonismo.

Grupos	Concentrações	AA		
		3,12 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL
NE	1,5 mg/mL	0,79	0,96	1,12
	4,5 mg/mL	0,79	0,87	0,79
	9,0 mg/mL	0,67	0,64	0,57
B	1,5 mg/mL	29,16	43,46	40,70
	4,5 mg/mL	2,79	4,91	12,80
	9,0 mg/mL	1,69	2,46	3,46
OL	1,5 mg/mL	1,01	1,26	1,45

	4,5 mg/mL	1,10	1,24	1,87
	9,0 mg/mL	1,03	1,03	1,03

**Tabela 4.** Valores dos índices de combinação (CI) para cada combinação entre NE/B/OL e AA, com 16 horas de tratamento. CI < 1: sinergismo; CI = 1: adição; CI > 1: antagonismo.

Grupos	Concentrações	AA		
		3,12 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL
NE	1,5 mg/mL	0,95	1,358	1,23
	4,5 mg/mL	0,53	0,899	2,36
	9,0 mg/mL	0,68	1,462	7,77
B	1,5 mg/mL	9,03	7,99	25,41
	4,5 mg/mL	1,21	1,51	2,93
	9,0 mg/mL	0,84	0,81	1,33
OL	1,5 mg/mL	0,69	0,64	0,64
	4,5 mg/mL	2,30	2,10	2,16
	9,0 mg/mL	0,39	2,10	0,40

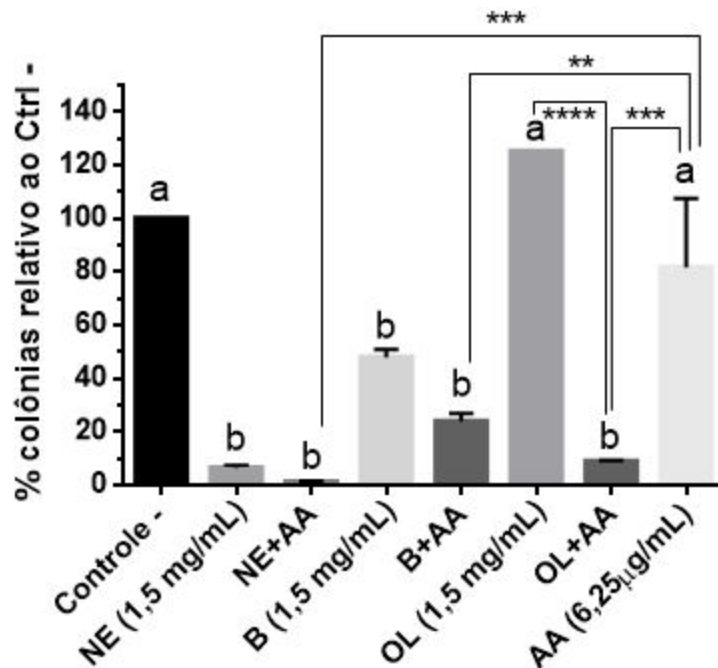
Os valores de CI obtidos nas tabelas acima indicam que o efeito resultante da combinação dos tratamentos depende dos componentes, do tempo de exposição e da dosagem de cada componente. Se por um lado o branco (B) parece interagir antagonicamente com o ácido anacárdico na maioria das concentrações nos dois tempos avaliados, a nanoemulsão e o óleo livre interagiram de modo muito dependente das concentrações combinadas com as concentrações de ácido anacárdico.

Para se dar prosseguimento à pesquisa dos mecanismos antimicrobianos da combinação da nanoemulsão, do branco e da oleorresina livre com o ácido anacárdico, foi decidido utilizar as concentrações de NE/B/OL igual a 1,5 mg/mL e de AA igual a 6,25 µg/mL, por mostrar a combinação que com menores concentrações e que renderia resultados mais claros a respeito da interação entre os componentes, visto que nesta combinação, as diferenças entre os tratamentos isolados e combinados aparenta ser mais clara, de acordo com os gráficos do ensaio de microdiluição (**Figura 12**).

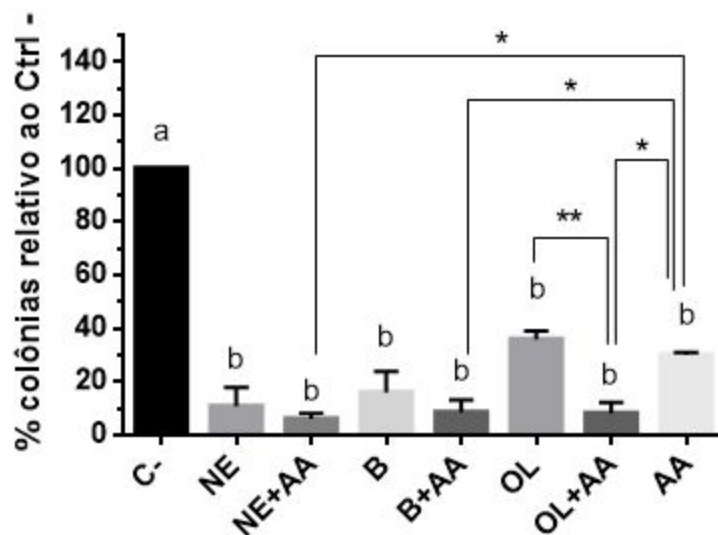
#### **5.2.3.2. Contagem de colônias em ágar após tratamentos**

Após o tratamento prévio por 6 ou 16 horas com a nanoemulsão, seu respectivo branco, a oleorresina de copaíba e o ácido anacárdico, isolados ou combinados, uma amostra de cada grupo foi coletada de cada poço, diluída 50.000 vezes e semeada sobre uma camada de ágar Mueller-Hinton para aferir-se a quantidade de colônias que se formaram após os tratamentos. Este método é comumente realizado em complementação aos ensaios de microdiluição para determinação da concentração bactericida mínima (CBM), e no presente trabalho foi utilizado com a finalidade de se comparar e se complementar os resultados obtidos no teste de microdiluição em caldo com resazurina. As **Figuras 13A e 13B** mostram, respectivamente os resultados quantitativos do ensaio de contagem de colônias após tratamento prévio por 6 horas ou 16 horas.





A.



B.

**Figura 13.** Percentual de colônias relativo ao controle, baseada na quantidade de colônias formadas sobre ágar, no tempo de 24 horas de incubação, após exposição prévia de (A) 6 horas e (B) 16 horas, com cada tratamento com NE/B/OL na concentração de 1,5 mg/mL, AA na concentração de 6,25 µg/mL e suas respectivas combinações (NE+AA, B+AA e OL+AA). Todos os grupos tratados diferiram

significativamente do controle ( $a \neq b$ ,  $p < 0,05$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

Para a maioria dos grupos, exceto NE e NE+AA, o efeito antimicrobiano foi tempo-dependente, apresentando maior atividade no tempo de 16 horas. A atividade antimicrobiana também foi aumentada com combinação da NE, do B e do OL com o AA, em comparação com esses tratamentos isolados. Por exemplo, no tempo de 6 horas e 16 horas, a NE solo apresentou viabilidade bacteriana de 6,25% e 10,70% enquanto a sua combinação com o ácido anacárdico (NE+AA) apresentou viabilidade bacteriana de 1,06% e 6,05%, respectivamente. Por sua vez, o ácido anacárdico isolado apresentou viabilidade de 81,69% e 30,00% nos tempos de 6 horas e 16 horas, respectivamente. Houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos NE+AA vs. AA, B+AA vs. AA, e OL+AA vs. AA, sendo que as combinações apresentaram uma atividade 80,63%, 33,82% e 72,75% maior do que o ácido anacárdico solo, respectivamente.

É notável que os resultados ilustrados pelo ensaio de contagem de colônias (**Figuras 13A e 13B**) diferem dos resultados expressos pelo ensaio de resazurina (**Figuras 12A e 12B**), sendo a contagem de colônias demonstrou atividade antimicrobiana muito maior para os tratamentos NE, NE+AA, B, B+AA e OL+AA, e muito menor para OL em comparação com o ensaio de microdiluição com resazurina. Isso se deve ao fato de cada uma dessas metodologias revelarem aspectos diferentes relacionados à viabilidade celular: enquanto o ensaio de resazurina avalia a atividade metabólica da população, o ensaio de contagem de colônias sugere a proporção de células viáveis e capazes de se multiplicarem. Por sua vez, o ensaio de contagem de colônias pode apresentar a limitação de não revelar células vivas incapazes de se dividirem e formarem colônias, conhecidas como *viáveis mas não cultiváveis* (VBNC, do inglês *viable but non-culturable*), que é uma possibilidade de estado fisiológico apresentada por algumas bactérias sugerida recentemente por alguns pesquisadores (HAASE et al., 2017).

Com base nesse método, a combinação da nanoemulsão com o ácido anacárdico (NE+AA), nas concentrações de 1,5 mg/mL de NE e 6,25 µg/mL de AA, foi o tratamento com maior atividade antibacteriana. O surfactante por si só também demonstrou expressiva atividade antibacteriana, reduzindo a quantidade de unidades formadoras de colônias.

Outros estudos da eficácia de nanoemulsões já foram conduzidos seguindo esta metodologia. Por exemplo, SARANYA, CHANDRASEKARAN & MUKHERJEE (2013) conduziram um estudo similar, utilizando a metodologia de contagem de colônia sobre ágar para determinar a atividade antimicrobiana de nanoemulsão à base de óleo de eucalipto contra *Proteus mirabilis* e constataram um efeito bactericida maior da nanoemulsão em comparação com o óleo livre ou com o surfactante Tween 20®.

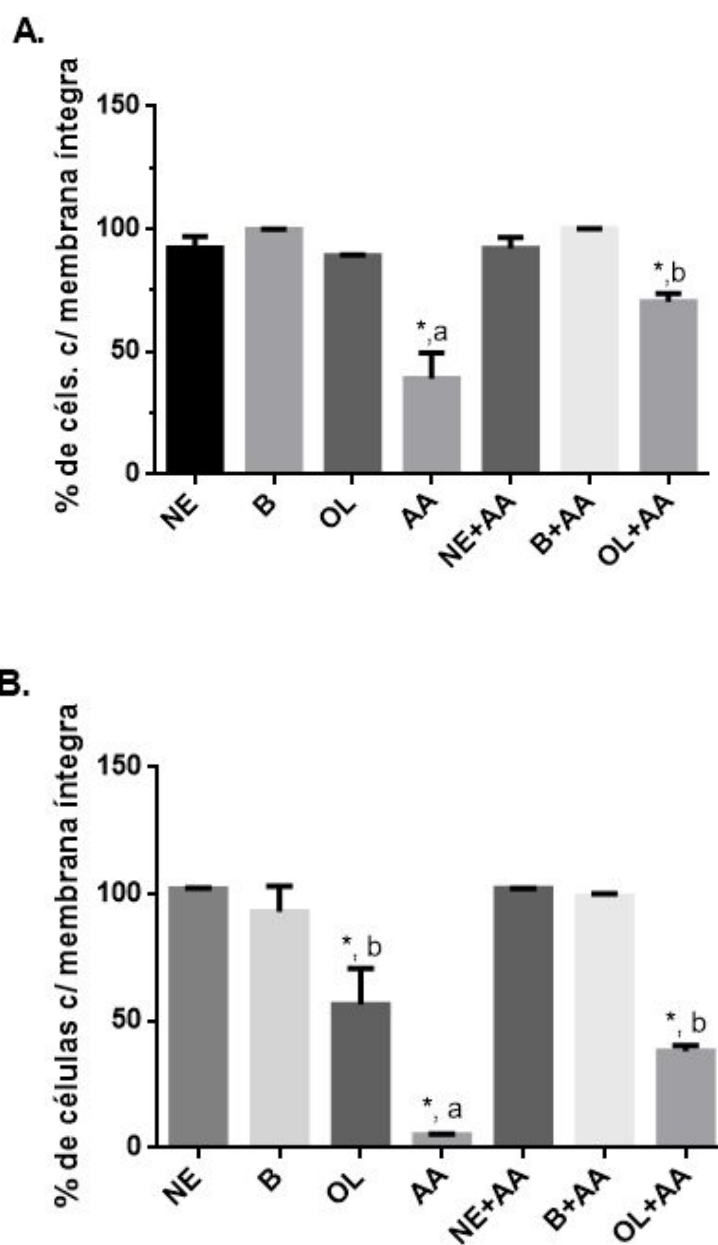
### 5.2.3.3. Citometria de fluxo

Com a finalidade de investigar outros aspectos antimicrobianos da nanoemulsão, também foi realizada a técnica de citometria de fluxo para coletar dados quantitativos acerca da integridade de membrana plasmática das bactérias após os tratamentos, por meio de marcação de DNA e emissão de fluorescência pelo iodeto de propídeo (IP) (LU et al, 2015; KUBO et al. 2018; LI et al., 2017), além de medidas indiretas acerca do tamanho (pelo espalhamento frontal da luz, ou *FSC*) e da granulometria -- ou seja, medida relacionada à quantidade de constituintes citoplasmáticos ou rugosidades na superfície das células -- (pelo espalhamento lateral da luz, ou *SSC*) das células bacterianas (TOMER, HARKER & BURSTEIN, 1988).

A **Figura 14**, referente à citometria com iodeto de propídeo após exposição de 6 horas das bactérias aos tratamentos, indica a proporção de células com membrana íntegra, ou seja, que não foram marcadas com o iodeto de propídeo, visto que este não atravessa facilmente membranas plasmáticas íntegras, e permeia com facilidade células lesionadas (LI et al., 2017). Vale ressaltar que essa metodologia não é capaz de

evidenciar células possivelmente mortas que apresentem membrana íntegra, cabendo assim parcimônia ao se interpretar esses dados e devendo-se comparar com os dados das outras metodologias utilizadas no presente trabalho. Como evidenciado na **Figura 14A**, os tratamentos de 6 horas com AA (6,25 µg/mL) e com OL+AA (1,5 mg/mL de óleo livre) reduziram em 60,91% e 29,64%, respectivamente, a proporção de células com membrana íntegra. No tempo de 16 horas (**Figura 14B**) houve a continuação da atividade antimicrobiana dos dois tratamentos supracitados, além de um aumento de 32,52% na proporção de células com lesão de membrana tratadas com OL isolado, sugerindo uma atividade bacteriolítica tempo-dependente desses compostos. Similarmente, Castillo-Juaréz et al. (2007), Stasiuk & Kozubek (2010), e Zengin & Baysal (2014) sugeriram a atividade bacteriolítica do óleo de copaíba e do ácido anacárdico. Entretanto, a atividade do AA aparenta ser diminuída na presença do OL, da NE, e do B, sugerindo alguma interação química antagônica entre esses componentes.

De acordo com esta técnica, os grupos NE e B, assim como as suas respectivas combinações com o AA, não apresentaram potencial bacteriolítico nas concentrações testadas, porém comparando com os resultados referentes à formação de colônias sobre meio ágar (**Figuras 13A e 13B**) e com o ensaio com resazurina (**Figuras 12A e 12B**), a citometria de fluxo com marcação de iodeto de propídeo pode não ter revelado células mortas por outro mecanismo que não tenha ocasionado lesão de membrana e, portanto, não foram marcadas com o fluoróforo. Desse modo, os mecanismos antimicrobianos da nanoemulsão e do ácido anacárdico são aparentemente diferentes entre si.



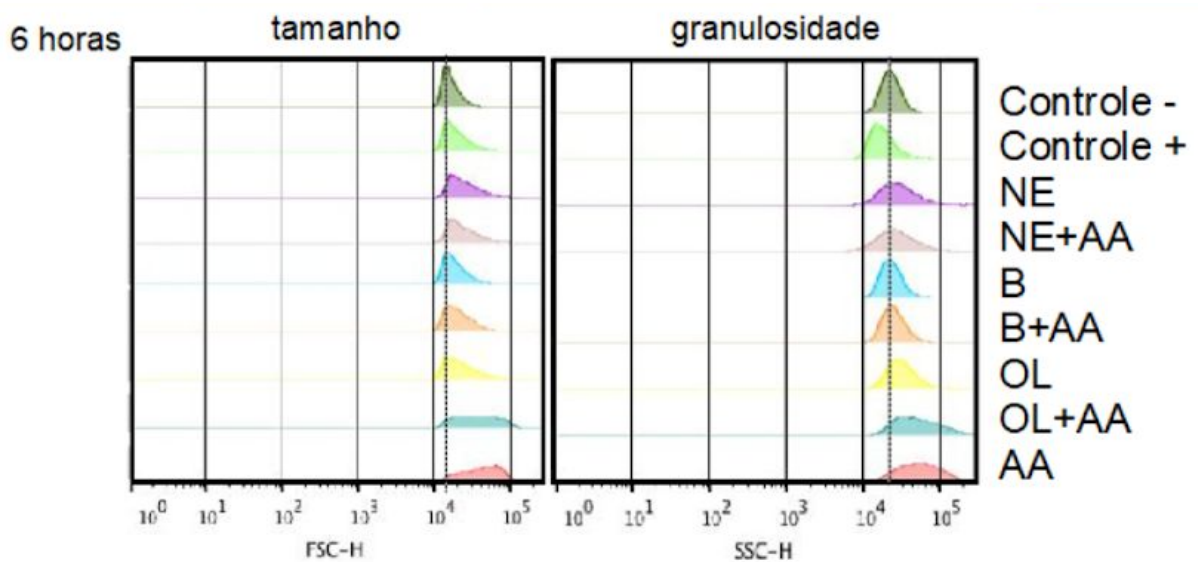
**Figura 14.** Integridade de membrana de células de *S. aureus* ATCC 25923, previamente tratadas por (A) 6 horas e (B) 16 horas com NE/B/OL na concentração de 1,5 mg/mL e AA na concentração de 6,25 µg/mL, isolados ou combinados. Asterisco indica  $p < 0,05$  em comparação com o controle, enquanto letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre tratamentos. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

A **Figura 15** apresenta os dados de FSC-H e SSC-H das populações de *S. aureus* previamente tratadas por 6 horas. Os valores dos parâmetros FSC e SSC são resultantes do ângulo de espalhamento do feixe de luz por cada evento no decorrer da citometria de fluxo. O parâmetro FSC está relacionado com a área da secção transversal das células e com seu índice de refração, enquanto o SSC está relacionado à rugosidade e à granulometria celular (GIVAN, 2013). Fica evidenciado nessa figura que houve alteração de tamanho e granulosidade e/ou rugosidade na maior parte dos grupos tratados, em particular com os tratamentos: óleo livre + AA, óleo livre, NE + AA, NE, B + AA, B e ácido anacárdico (AA).

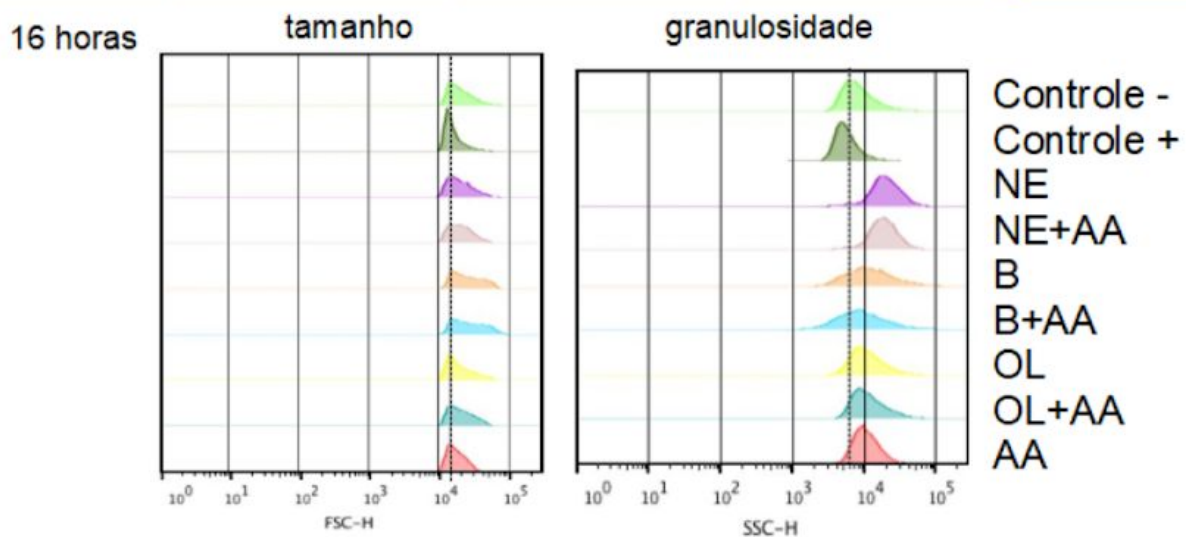
Estes resultados dão indícios de que esses tratamentos podem estar interagindo com as células (por exemplo, a adesão das nanogotículas às superfícies das células) ou exercendo alguma alteração morfofisiológica sobre as células. Por exemplo, o aumento dos valores de FSC e SSC das células tratadas com OL+AA ou AA, juntamente com os resultados da marcação com iodeto de propídeo podem ser evidências de que houve aumento da permeabilidade de membrana, provavelmente causada pela atuação conjunta do ácido anacárdico e do óleo de copaíba. CAMARGOS *et al.* (2014) demonstrou a alteração da dinâmica de lipídios da membrana plasmática de promastigotos de *Leishmania amazonensis* após tratamento com terpenos, assim como DI PASQUA *et al* (2007) também comprovou a alteração na composição lipídica da membrana plasmática de *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens* e *Brochothrix thermosphacta* após o tratamento com o terpeno limoneno ou com outras moléculas de outras classes. CASTILLO-JUÁREZ *et al.* (2007) constataram por microscopia eletrônica de transmissão a ruptura de membrana citoplasmática de células de *Helicobacter pylori* tratadas com ácidos anacárdicos saturados (C<sub>15:0</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>17:0</sub> e C<sub>19:0</sub>), corroborando com a hipótese proposta acima.

Por sua vez, os resultados do ensaio de citometria de fluxo realizado com células tratadas por 16 horas estão ilustrados na **Figura 16**, que apresenta os histogramas de

distribuição dos valores de FSC-H e SSC-H dos eventos referentes a cada grupo. Houve alterações expressivas de SSC, após 16 horas de tratamento, nos seguintes grupos: NE + AA, NE, B+AA e B. Esses resultados indicam que houve um aumento da granulometria, sem alteração aparente do tamanho das células, podendo ser um indício da maior interação da nanoemulsão NE e das nanogotículas de B com as células bacterianas no momento da coleta dos dados. Isso é esperado, visto que quanto maior o tempo de exposição das células às formulações, maior a probabilidade de interação.



**Figura 15.** Histogramas da dispersão referentes aos dados de FSC-H e SSC-H das células de *S. aureus* ATCC 25923 previamente tratadas por 6 horas com 6,25 µg/mL de ácido anacárdico; 1,5 mg/mL de NE/B/OL isolados ou combinados com o AA; isopropanol 70%; e controle negativo. A linha vertical cinza indica o ponto onde encontra-se o pico do controle (C-).



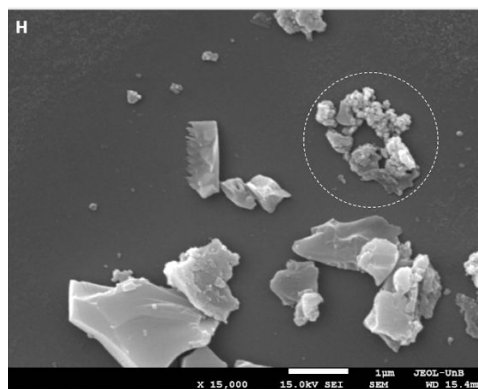
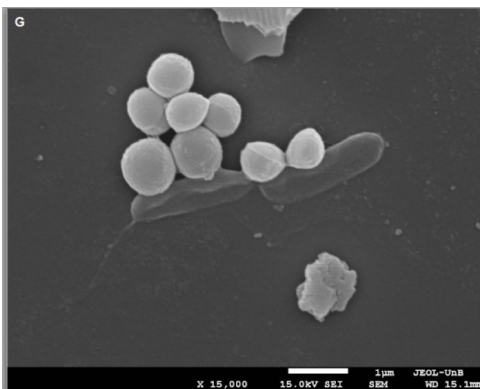
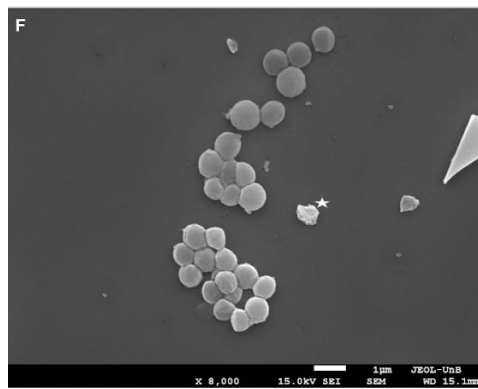
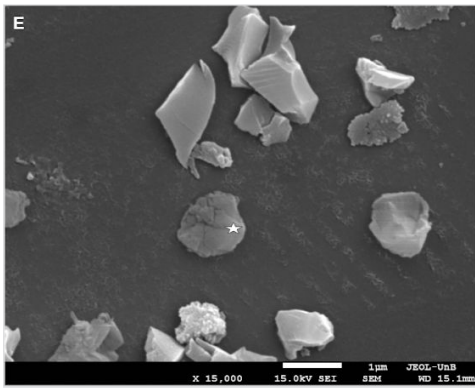
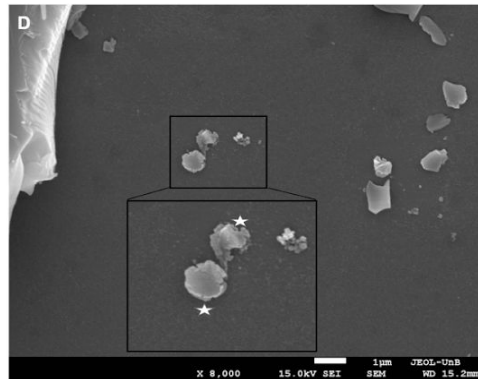
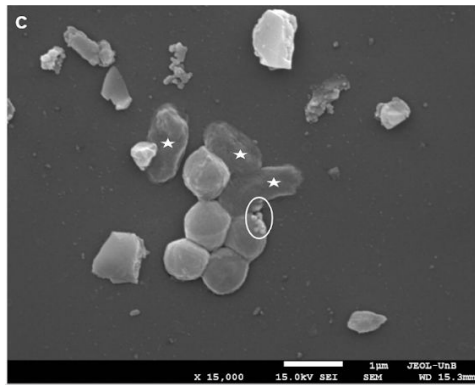
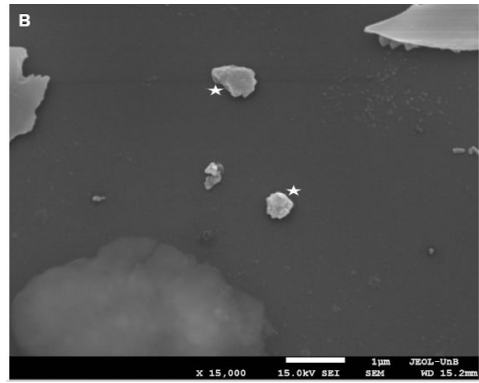
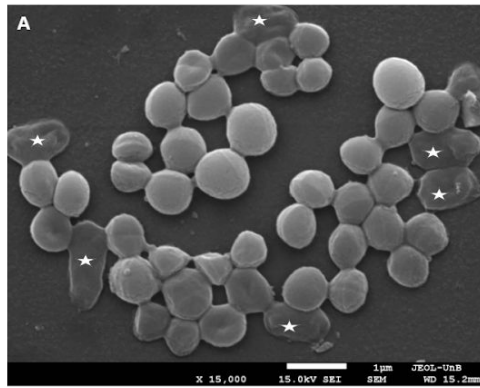
**Figura 16.** Histogramas da dispersão referentes aos dados de FSC-H e SSC-H das células de *S. aureus* ATCC 25923 previamente tratadas por 16 horas com 6,25 µg/mL de ácido anacárdico; 1,5 mg/mL de NE/B/OL isolados ou combinados com o AA; isopropanol 70% (aplicado após 16 horas de crescimento bacteriano); e controle negativo. A linha vertical cinza indica o ponto onde encontra-se o pico do controle (C-).

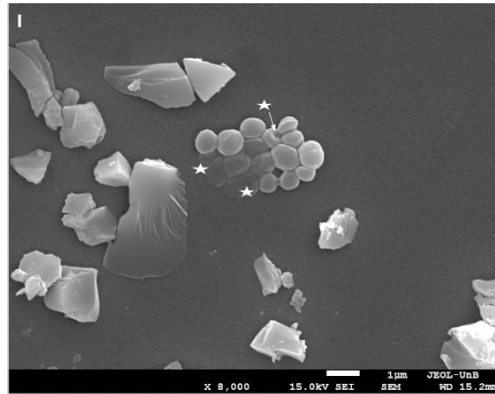
Nos próximos tópicos do presente estudo, serão mostrados e discutidos os resultados das microscopias eletrônicas de varredura, e comparados com os resultados obtidos pela citometria de fluxo, pela contagem de colônias sobre ágar e pelo ensaio com resazurina.

#### 5.2.3.4. Microscopia eletrônica de varredura

As bactérias pertencentes a cada grupo experimental foram analisadas em seus aspectos morfológicos por microscopia eletrônica de varredura (MEV), podendo ser observados mudanças no aspecto e danos na parede celular, mudança de tamanho das células, concentração de células e divisão celular (**Figuras 17A-I**).







**Figura 17.** Micrografias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 após 6 horas de tratamento com: (A) controle negativo; (B) controle positivo C+ (isopropanol); (C) nanoemulsão de oleorresina de copaíba, NE; (D) nanoemulsão e ácido anacárdico, NE+AA; (E) branco, B; (F) branco e ácido anacárdico, B+AA; (G) oleorresina de copaíba livre, OL; (H) oleorresina de copaíba livre e ácido anacárdico, OL+AA; (I) ácido anacárdico, AA. Legenda - Estrela: células mortas; círculo tracejado: mineralização produzida por *S. aureus*; círculo contínuo (imagem C): gotículas da nanoemulsão aderidas à parede celular.

Na micrografia do grupo controle negativo, **Figura 17A**, pode-se notar quantidade abundante de células, em sua maioria com morfologia de células viáveis, com formato arredondado, diâmetro de aproximadamente 1 µm, unidas formando um aglomerado de células com arranjo típico de estafilococos. Há a presença de poucas células mortas (indicadas estrela branca).

Por sua vez, a micrografia do controle positivo de isopropanol, **Figura 17B**, revela duas células mortas, apontadas pelas estrelas brancas, apresentando aspecto rugoso ou disforme e diminuição de volume. A escassez de células na lâmina também revela a toxicidade do tratamento com isopropanol, como era esperado.

Na **Figura 17C**, pode-se observar o resultado do tratamento com a nanoemulsão (NE): algumas células mortas, inclusive com aparente ruptura da sua parede celular, em meio a uma colônia de células aparentemente íntegras. Sobre uma das células, pode-se observar o contato do que hipotetiza-se serem nanogotículas da nanoemulsão

com a sua superfície (círculo contínuo). Moghimi et al. (2016) demonstraram atividade bacteriolítica mais acelerada da nanoemulsão de óleo essencial de *Thymus daenensis* (diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente 143 nm) em *Escherichia coli*, quando comparado com o óleo livre, sugerindo que a nanoemulsão tem uma maior facilidade para interagir com a célula bacteriana do que o óleo livre. Bhargava e colaboradores (2015) demonstraram a atividade bacteriolítica da nanoemulsão de óleo de orégano contra *E. coli*, *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*. Há inúmeros trabalhos na literatura demonstrando o aumento da eficácia de nanoemulsificação de óleos com atividade antimicrobiana, devido ao aumento da dispersão de compostos hidrofóbicos em meio aquoso, à interação das nanogotículas com a membrana plasmática bacteriana e à liberação sustentada do óleo, prolongando a sua atividade (Donsi & Ferrari, 2016). Vale ressaltar que a composição da fase oleosa e a natureza do surfactante (Majeed et al, 2016) podem acarretar em diferentes mecanismos de ação, mas a natureza hidrofóbica da fase oleosa no mínimo acarreta na desestabilização da membrana plasmática. (Donsi & Ferrari, 2016; Rao, Chen & McClements, 2019)

Na **Figura 17D**, está representado o tratamento com a combinação da nanoemulsão com o ácido anacárdico (NE+AA). São destacadas duas células com clara destruição de parede celular. Não obstante, a lâmina como um todo apresentou pouca quantidade de células.

A **Figura 17E** revela o tratamento com a formulação sem oleorresina, o branco (B), com a indicação de uma célula morta (marcada com uma estrela) com clara alteração da parede celular (aspecto enrugado). Esta imagem é indício de que o surfactante apresenta alguma toxicidade à célula bacteriana, podendo interagir com a parede e/ou membrana celular. Além disso, havia uma escassez de células íntegras sobre a lâmina. Não foram encontrados trabalhos prévios acerca da atividade antimicrobiana da lecitina de ovo, utilizada como surfactante das nanoemulsões o presente estudo.

Em contraste, a **Figura 17F**, que mostra o tratamento com o branco e o ácido anacárdico (B+AA), apresenta uma quantidade maior de células íntegras, indicando

apenas uma célula morta no campo delimitado pela imagem. Esse dado corrobora com a hipótese de que a combinação entre o ácido anacárdico e o branco é de natureza antagônica, como previsto pelos cálculos do índice de combinação pelo modelo de Chou-Talalay e pela citometria de fluxo (**Tabelas 3 e 4, Figura 14**).

Por sua vez, o tratamento com o óleo livre (OL), representado pela **Figura 17G**, ilustra um aglomerado de células íntegras. Não foi possível identificar células mortas na lâmina deste grupo, porém esperava-se encontrar células com sinais de lise celular, baseando-se nos seguintes trabalhos: Dos Santos et al. (2013) demonstrou alterações na parede celular e no processo de divisão celular em *Bacillus cereus* tratado com oleorresina de *Copaifera duckei*, indicando os prováveis mecanismos de ação causados pelos óleos de copaíba. Zengin & Baysal (2014) conduziram um estudo quantitativo (microdiluição em caldo) e qualitativo (microscopia eletrônica de varredura) a fim de avaliar a atividade antimicrobiana de três terpenos contra quatro cepas de Gram-negativas e três cepas de Gram-positivas. Eles constataram a concentração inibitória mínima em *S. aureus* igual a 0,7% para alfa-terpineol, 1% para linalool e 2% para eucaliptol, e observaram atividade bactericida, sugerindo a parede celular como o mais provável alvo dos terpenos.

Em comparação com a **Figura 17H**, que representa o tratamento combinado da oleorresina de copaíba livre com o ácido anacárdico (OL+AA), a combinação apresentou uma maior eficácia do que a oleorresina solo, visto que foi observada uma escassez de células na lâmina (dados não apresentados) e uma grande quantidade de debris celulares, levando a concluir que a combinação desses tratamentos gera uma atividade bacteriolítica.

Por último, representado pela **Figura 17I** está o tratamento com o ácido anacárdico solo, apresentando uma colônia com 16 células, onde algumas células (mais escuras) apresentam alteração de tamanho e morfologia. Além disso, em uma das células destacadas pela seta tracejada pode-se perceber um vale na parede celular, podendo ser indício de dano celular. Rivero-Cruz et al (2011) relataram a atividade antimicrobiana de quatro ácidos anacárdicos, incluindo o C<sub>15:0</sub>, contra *S.*

*mutans* e *P. gingivalis*. Castillo-Juárez e colaboradores (2007) observaram que a mistura de quatro ácidos anacárdicos insaturados ( $C_{15:0}$ ,  $C_{16:0}$ ,  $C_{17:0}$  e  $C_{19:0}$ ) extraídos de *Amphipterygium adstringens* induziram a morte de *H. pylori*, aparentando disruptura de membrana em micrografias eletrônicas de transmissão. Adicionalmente, Kubo, Nihei e Tsujimoto (2003) constataram a inibição de NADH oxidase em *Micrococcus luteus* e *P. aeruginosa* tratadas com ácidos anacárdicos, incluindo o  $C_{15:0}$ , afetando desta forma a respiração celular aeróbica dessas bactérias, mostrando mais um importante mecanismo bactericida contra bactérias aeróbias obrigatórias.

#### **5.2.3.5. Comparação dos resultados de viabilidade celular: ensaio metabólico (resazurina), ensaio de contagem de colônias (células viáveis), citometria de fluxo e microscopia eletrônica de varredura**

Concatenando os resultados apresentados nesta dissertação e comparando-os com resultados da literatura científica, a hipótese de que há atividade parcialmente sinérgica ou aditiva na combinação entre a nanoemulsão à base de oleorresina de *C. officinalis* e o ácido anacárdico, nas respectivas concentrações 1,5 mg/mL e 6,25 µg/mL, é sustentada pelo cálculo do índice de combinação pelo modelo de Chou-Talalay (**Tabelas 3 e 4**), pelo ensaio de semeadura em ágar com contagem de colônias (**Figura 13**) e pela microscopia eletrônica de varredura (**Figura 17D**). Foi demonstrado pelo método de contagem de colônias em ágar e pela microscopia eletrônica de varredura que a combinação NE+AA foi mais eficaz do que os componentes NE e AA isolados. Por apresentarem, possivelmente, mecanismos de ação diferentes, a combinação do ácido anacárdico com o óleo de copaíba pode ser uma interessante estratégia no combate de bactérias patogênicas. Não obstante, a otimização da nanoemulsão e o estabelecimento das melhores concentrações de cada tratamento para a combinação devem ser estabelecidas em estudos futuros.

Em contraste com as demais metodologias, os ensaios com resazurina apresentaram alguns resultados muito diferentes dos demais (**Tabela 5**). É possível que este reagente não seja o mais adequado para se avaliar a viabilidade celular de bactérias como *S. aureus*, pois a resazurina é convertida em resorufina por meio da respiração celular, enquanto o *S. aureus* é uma bactéria anaeróbia facultativa, podendo em situações de fermentação, alteração de pH ou de rápido metabolismo, converter a resorufina (rosa e fluorescente) em diidroresorufina (incolor e não-fluorescente) e gerar resultados enviesados (Tratnyek *et al.*, 2001).

Este trabalho também corroborou com estudos anteriores que demonstraram a atividade antibacteriana da oleorresina de *Copaifera officinalis* (PIERI *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2008) e do ácido anacárdico C<sub>15:0</sub> solo (RIVERO-CRUZ *et al.*, 2011), porém este é inédito quanto à investigação da atividade antimicrobiana da combinação desses dois compostos.

Outro ineditismo deste trabalho foi a apresentação de evidências acerca da atividade antagônica entre o ácido anacárdico e o surfactante utilizado, sugerida pelo índice de combinação (**Tabelas 3 e 4**), pela citometria de fluxo (**Figura 14**) e pela microscopia eletrônica de varredura (**Figuras 17E e 17F**). Acredita-se pela característica hidrofóbica do surfactante e da cadeia alquila do ácido anacárdico, as nanogotículas da formulação B devam interagir com mais afinidade com o ácido anacárdico presente no meio, desviando o alvo de sua atividade antimicrobiana. Além disso, o surfactante por si só apresentou significativa toxicidade de acordo com os ensaios de microdiluição, de semeadura em ágar e de microscopia eletrônica de varredura (**Figuras 12, 13 e 17E**), mas não apresentou a mesma toxicidade de acordo com o ensaio de citometria de fluxo. Deve-se investigar mais a fundo o que possivelmente pode ter acontecido neste caso. Sugere-se que possa haver interação dos grupos fosfato, hidroxila e amina dos fosfolipídeos do surfactante com outros grupos funcionais presentes nos constituintes da parede celular bacteriana. Até o momento, não se tem conhecimento sobre trabalhos prévios a respeito da atividade antimicrobiana da lecitina.

Entretanto, para o tratamento combinado B+AA, os resultados de semeadura em ágar não estão em concordância com os demais resultados, mostrando um número menor de células viáveis do que nos demais experimentos. Como citado anteriormente neste trabalho, alguns autores defendem a existência de um estado fisiológico em algumas bactérias conhecidas como “viáveis mas não cultiváveis” (Haase et al, 2017), e este pode ser um dos casos. Porém, outros estudos devem ser feitos para que isso seja confirmado.

**Tabela 5.** Resumo comparativo dos tratamentos em relação aos seus efeitos antimicrobianos.

Efeito antibacteriano	Microdiluição		Contagem de Colônias	Citometria (integ. de membrana)	MEV
	Resazurina	Índice de Combinação			
<b>NE vs NE+AA</b>	n.s.	6h: sin. leve 16h: antag.	n.s.	n.s.	NE+AA > NE
<b>B vs B+AA</b>	n.s.	6h: antag. 16h: antag.	n.s.	n.s.	B > B+AA
<b>OL vs OL+AA</b>	n.s.	6h: antag. leve 16h: synerg.	OL+AA > OL	OL+AA	OL+AA > OL
<b>AA vs. NE+AA</b>	6h: NE+AA > AA 16h: n.s.		NE+AA > AA	AA > NE+AA	NE+AA > AA
<b>AA vs B+AA</b>	6h: AA > B+AA 16h: n.s.		B+AA > AA	AA > B+AA	AA > B+AA
<b>AA vs OL+AA</b>	6h e 16h: OL+AA > AA		OL+AA > AA	AA > OL+AA	OL+AA > AA

Legenda: n.s. = estatisticamente não-significativo.

## 6. Conclusão

Duas nanoemulsões à base de oleorresina de copaíba foram formuladas, diferindo quanto a proporção entre surfactante e óleo (NE 1:1 e NE 2:1, m/m). A nanoemulsão com menor quantidade de surfactante (NE 1:1) foi a que apresentou melhor atividade antimicrobiana, sugerindo que a quantidade de surfactante tem influência direta na eficácia da formulação.

Esta nanoemulsão foi caracterizada quanto ao seu diâmetro hidrodinâmico, potencial-Zeta e índice de polidispersão, cujos valores respectivamente foram iguais a  $171,7 \text{ nm} \pm 3,3 \text{ nm}$ ,  $-36,8 \text{ mV} \pm 0,6 \text{ mV}$  e  $0,372 \pm 0,073$ , e permaneceram estáveis ao longo do tempo de análise de 60 dias, não apresentando sinais de cremagem, floculação ou separação de fase. Entretanto, a fim de se otimizar os valores de polidispersão e determinação de uma quantidade ótima de surfactante com eficácia antimicrobiana igual ou melhor, sugere-se a condução de estudos futuros voltados para o melhoramento desta formulação.

Foi testada a atividade antimicrobiana do ácido anacárdico  $C_{15:0}$  solo e constatou-se a sua atividade antimicrobiana dose- e tempo-dependente contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Com base nos ensaios de microdiluição em caldo, semeadura em ágar, citometria de fluxo com marcação de iodeto de propídio e microscopia eletrônica de varredura, sugere-se que o mecanismo de ação dessa molécula seja por disruptura de membrana plasmática.

A nanoemulsão de oleorresina de copaíba apresentou atividade antiestafilocócica, assim como o óleo livre. O mecanismo de ação da nanoemulsão continua a ser elucidado em experimentos futuros, enquanto que para o óleo livre sugere-se ser pela destruição da parede celular, e talvez pela disruptura da membrana plasmática devido ao seu caráter hidrofóbico e provável afinidade com os lipídeos da membrana. É sugerido que outras técnicas (como a microscopia eletrônica de transmissão) sejam empregadas futuramente para se confirmar esses mecanismos de ação.



Quanto aos ensaios de combinação, a nanoemulsão combinada com o ácido anacárdico demonstrou uma maior eficácia do que estes compostos administrados isoladamente. De acordo com o índice de combinação calculado com o modelo matemático de Chou-Talalay, a combinação entre esses dois componentes pode ser aditiva ou sinérgica, dependendo das concentrações combinadas de cada componente. No caso da combinação testada na maior parte dos experimentos, de 1,5 mg/mL de NE com 6,25 µg/mL de AA, sugere-se uma atividade considerada moderadamente sinérgica, por apresentar um valor de CI abaixo de 1. Sugere-se que essa combinação seja bactericida, com base na microscopia eletrônica de varredura e no ensaio de contagem de colônias sobre ágar.

Diferentemente, o índice de combinação indicou atividade moderadamente antagônica no tempo de 6 horas, e sinérgica no tempo de 16 horas para a combinação da oleorresina livre com o ácido anacárdico nas concentrações de 1,5 mg/mL de OL e 6,25 µg/mL de AA. Pode-se observar nos experimentos de contagem de colônias e na microscopia eletrônica de varredura um incremento da atividade antimicrobiana quando os dois compostos são combinados, constatando um aumento do número de células lisadas. Entretanto, o ensaio de citometria sugere um aparente antagonismo entre os dois compostos.

Por fim, a combinação do surfactante com o ácido anacárdico livre pelos ensaios de microdiluição em caldo, pelo cálculo do índice de combinação e pela microscopia eletrônica de varredura revelaram uma atividade antagonista na maioria das concentrações combinadas e em ambos os tempos analisados.

## REFERÊNCIAS

Abrão, F., de Araújo Costa, L. D., Alves, J. M., Senedese, J. M., de Castro, P. T., Ambrósio, S. R., ... & Martins, C. H. G. (2015). Copaifera langsdorffii oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 443.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Antimicrobianos - Bases Teóricas e Uso Clínico. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/daptomicina.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/daptomicina.htm)>. Acessado em: 05 Jan 2019.

AGOSTINI-SILVA, T. D. S., Jales, K. A., de OLIVEIRA, M. E. B., & GARRUTI, D. D. S. (2005). Determinação espectrofotométrica de ácido anacárdico em amêndoas de castanha de caju. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico*.

Alencar, É. N., Xavier-Júnior, F. H., Morais, A. R., Dantas, T. R., Dantas-Santos, N., Verissimo, L. M., ... & Egito, E. (2015). Chemical characterization and antimicrobial activity evaluation of natural oil nanostructured emulsions. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 15(1), 880-888.

American Chemical Society International Historic Chemical Landmarks. Discovery and Development of Penicillin. Disponível em: <<http://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/flemingpenicillin.html>>. Acessado em: 05 Jan 2019.

Anton, N., & Vandamme, T. F. (2011). Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. *Pharmaceutical research*, 28(5), 978-985.

ARAÚJO, Henrique Loback Lopes de. Efeitos de combinações entre o ácido anacárdico derivado da casca da castanha do caju (*Anacardium occidentale*) e o óleo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), livres ou nanoestruturados, no tratamento de células de câncer de pele não melanoma, in vitro. 2017. 86 f., il. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia)—Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

ARAÚJO, V. H. S. Nanoemulsões à base de óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*): síntese, caracterização e avaliação do efeito em células de carcinoma mamário. Brasília. 2016. 48 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

Azam, A., Ahmed, A. S., Oves, M., Khan, M. S., Habib, S. S., & Memic, A. (2012). Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *International journal of nanomedicine*, 7, 6003.

Baldissera, M. D., Da Silva, A. S., Oliveira, C. B., Zimmermann, C. E., Vaucher, R. A., Santos, R. C., ... & Koester, L. (2013). Trypanocidal activity of the essential oils in their conventional and nanoemulsion forms: in vitro tests. *Experimental parasitology*, 134(3), 356-361.

Bardají, D. K. R., da Silva, J. J. M., Bianchi, T. C., de Souza Eugênio, D., de Oliveira, P. F., Leandro, L. F., ... & Bastos, J. K. (2016). *Copaifera reticulata* oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. *Anaerobe*, 40, 18-27.

Bhargava, K., Conti, D. S., da Rocha, S. R., & Zhang, Y. (2015). Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. *Food microbiology*, 47, 69-73.

Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential—What they are and what they are not?. *Journal of Controlled Release*, 235, 337-351.

Berri, M., Slugocki, C., Olivier, M., Helloin, E., Jacques, I., Salmon, H., ... & Collen, P. N. (2016). Marine-sulfated polysaccharides extract of *Ulva armoricana* green algae exhibits an antimicrobial activity and stimulates cytokine expression by intestinal epithelial cells. *Journal of applied phycology*, 28(5), 2999-3008.

Biavatti, M. W., Dossin, D., Deschamps, F. C., & Lima, M. D. P. (2006). Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. *Rev Bras Farmacogn*, 16(2), 230-5.

Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51.

Blower, R. J., Barksdale, S. M., & van Hoek, M. L. (2015). Snake cathelicidin NA-CATH and smaller helical antimicrobial peptides are effective against *Burkholderia thailandensis*. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(7), e0003862.

Camargos, H. S., Moreira, R. A., Mendanha, S. A., Fernandes, K. S., Dorta, M. L., & Alonso, A. (2014). Terpenes increase the lipid dynamics in the *Leishmania* plasma membrane at concentrations similar to their IC50 values. *PLoS One*, 9(8), e104429.

Carvalho, J. C. T., Cascon, V., Possebon, L. S., Morimoto, M. S. S., Cardoso, L. G. V., Kaplan, M. A. C., & Gilbert, B. (2005). Topical anti-inflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to*

*Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 19(11), 946-950.

Castillo-Juárez, I., Rivero-Cruz, F., Celis, H., & Romero, I. (2007). Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 114(1), 72–77.

Castro, M. S., Ferreira, T. C. G., Cilli, E. M., Crusca Jr, E., Mendes-Giannini, M. J. S., Sebben, A., ... & Fontes, W. (2009). Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). *Peptides*, 30(2), 291-296.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2016). General information about MRSA in the community. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mrsa/community/index.html>>. Acesso em 12 de dezembro de 2016.

Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65(2), 232-260.

Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer research*, 0008-5472.

De, R., Kundu, P., Swarnakar, S., Ramamurthy, T., Chowdhury, A., Nair, G. B., & Mukhopadhyay, A. K. (2009). Antimicrobial activity of curcumin against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(4), 1592-1597.

Deacon, J., Abdelghany, S. M., Quinn, D. J., Schmid, D., Megaw, J., Donnelly, R. F., ... & Taggart, C. C. (2015). Antimicrobial efficacy of tobramycin polymeric nanoparticles for *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis: Formulation, characterisation and functionalisation with dornase alfa (DNase). *Journal of Controlled Release*, 198, 55-61.

Diefenbach, A. L., Muniz, F. W. M. G., Oballe, H. J. R., & Rösing, C. K. (2018). Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera* ssp.) on oral pathogens: Systematic review. *Phytotherapy Research*, 32(4), 586-596.

Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., & Mauriello, G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(12), 4863-4870.

Donsi, F., Annunziata, M., Sessa, M., & Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology*, 44(9), 1908-1914.

Donsi, F., & Ferrari, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of biotechnology*, 233, 106-120.

Eid, A. M. M., Elmarzugj, N. A., & El-Enshasy, H. A. (2013). Preparation and evaluation of olive oil nanoemulsion using sucrose monoester. *Int J Pharm Pharm Sci*, 5(Suppl 3), 434-440.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). *Sistema de Produção do Caju*. Disponível em: [https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistemas\\_deproducaolf6\\_1ga1ceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_state=normal](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemas_deproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_state=normal)

[p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_count=1&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaoid=7705&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicoid=10308](#)>. Acessado em: 06 Jan 2019.

Esquerdo, V. M., Dotto, G. L., & Pinto, L. A. A. (2015). Preparation of nanoemulsions containing unsaturated fatty acid concentrate–chitosan capsules. *Journal of colloid and interface science*, 445, 137-142.

Feynman, R.P. (1960). There's plenty of room at the bottom. *Engineering and Science*, vol. 23, n.5, p. 22–36.

Fischer, S., & Gräber, P. (1999). Comparison of  $\Delta\text{pH}$ -and  $\Delta\phi$ -driven ATP synthesis catalyzed by the H<sup>+</sup>-ATPases from *Escherichia coli* or chloroplasts reconstituted into liposomes. *FEBS letters*, 457(3), 327-332.

Food and Drug Administration. Food Additive Status List. Disponível em: <  
<https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm091048.htm>>. Acessado em: 19 Mar 2019.

Foster T. *Staphylococcus*. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8448/>

Foucquier, J., & Guedj, M. (2015). Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology research & perspectives*, 3(3).

Gaoe, H., Pang, Z., Pan, S., Cao, S., Yang, Z., Chen, C., & Jiang, X. (2012). Anti-glioma effect and safety of docetaxel-loaded nanoemulsion. *Archives of pharmacal research*, 35(2), 333-341.

Gelmini, F., Beretta, G., Anselmi, C., Centini, M., Magni, P., Ruscica, M., ... Maffei Facino, R. (2013). GC-MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. *International Journal of Pharmaceutics*, 440(2), 170–178.

Genot, C., Kabri, T.-H., & Meynier, A. (2013). Stabilization of omega-3 oils and enriched foods using emulsifiers. *Food Enrichment with Omega-3 Fatty Acids*, 150–193.

Givan, A. L. (2013). *Flow cytometry: first principles*. John Wiley & Sons.

Gupta, P. V., Nirwane, A. M., & Nagarsenker, M. S. (2018). Inhalable Levofloxacin Liposomes Complemented with Lysozyme for Treatment of Pulmonary Infection in Rats: Effective Antimicrobial and Antibiofilm Strategy. *AAPS PharmSciTech*, 1-14.

Haase, H., Jordan, L., Keitel, L., Keil, C., Mahltig, B. (2017). Comparison of methods for determining the effectiveness of antibacterial functionalized textiles. *PLoS ONE* 12(11): e0188304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188304>

HAMAD, F.B.; MUBOFU, E.B. (2015). Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 8569-8590.

Hanaor, D., Michelazzi, M., Leonelli, C., & Sorrell, C. C. (2012). The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO<sub>2</sub>. *Journal of the European Ceramic Society*, 32(1), 235-244.

He, W., Tan, Y., Tian, Z., Chen, L., Hu, F., & Wu, W. (2011). Food protein-stabilized nanoemulsions as potential delivery systems for poorly water-soluble drugs: preparation,



in vitro characterization, and pharmacokinetics in rats. *International journal of nanomedicine*, 6, 521.

Himejima, M.; Kubo, I. (1991). Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 418-421.

Hwang, I. S., Hwang, J. S., Hwang, J. H., Choi, H., Lee, E., Kim, Y., & Lee, D. G. (2013). Synergistic effect and antibiofilm activity between the antimicrobial peptide coprisin and conventional antibiotics against opportunistic bacteria. *Current microbiology*, 66(1), 56-60.

Organização Internacional para Padronização. ISO/TS 80004-1:2015, Nanotechnologies – Vocabulary – Part 1: Core terms.

Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Veiga Jr, V. F., Pinto, A. C., & Nakamura, C. V. (2012). Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(7), 2994-3001.

Junior, V. V., Rosas, E. C., Carvalho, M. V. D., Henriques, M. D. G. M. D. O., & Pinto, A. C. (2007). Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(2), 248-254.

Knetsch, M. L., & Koole, L. H. (2011). New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers*, 3(1), 340-366.

Krishnamoorthy, R., Athinarayanan, J., Periasamy, V. S., Adisa, A. R., Al-Shuniaber, M. A., Gassem, M. A., & Alshatwi, A. A. (2018). Antimicrobial activity of nanoemulsion on drug-resistant bacterial pathogens. *Microbial pathogenesis*, *120*, 85-96.

Kubo, A. L., Capjak, I., Vrček, I. V., Bondarenko, O. M., Kurvet, I., Vija, H., ... & Kahru, A. (2018). Antimicrobial potency of differently coated 10 and 50 nm silver nanoparticles against clinically relevant bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.

Kubo, I., Nihei, K., & Tsujimoto, K. (2003). Antibacterial Action of Anacardic Acids against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(26), 7624–7628.

Kuo, W. S., Shao, Y. T., Huang, K. S., Chou, T. M., & Yang, C. H. (2018). Antimicrobial Amino-Functionalized Nitrogen-Doped Graphene Quantum Dots for Eliminating Multidrug-Resistant Species in Dual-Modality Photodynamic Therapy and Bioimaging under Two-Photon Excitation. *ACS applied materials & interfaces*, *10*(17), 14438-14446.

Li, J., Ding, T., Liao, X., Chen, S., Ye, X., & Liu, D. (2017). Synergetic effects of ultrasound and slightly acidic electrolyzed water against *Staphylococcus aureus* evaluated by flow cytometry and electron microscopy. *Ultrasonics sonochemistry*, *38*, 711-719.

Li, Y., Liu, G., Wang, X., Hu, J., & Liu, S. (2016). Enzyme-Responsive Polymeric Vesicles for Bacterial-Strain-Selective Delivery of Antimicrobial Agents. *Angewandte Chemie International Edition*, *55*(5), 1760-1764.

Li, W. R., Xie, X. B., Shi, Q. S., Duan, S. S., Ouyang, Y. S., & Chen, Y. B. (2011). Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biometals*, 24(1), 135-141.

LIMA, Luiza lanny de. Desenvolvimento de uma nanoformulação autoemulsificante contendo o alcalóide epiisopiloturina para melhorar sua biodisponibilidade plasmática após administração via oral. 2016. vi, 49 f., il. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia)—Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

Liu, X., Li, Z., Wang, X., Chen, Y., Wu, F., Men, K., ... & Yang, L. (2016). Novel antimicrobial peptide–modified azithromycin-loaded liposomes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International journal of nanomedicine*, 11, 6781.

Lu, X., Jin, X., & Zhu, J. (2015). Flow Cytometry and Electron Microscopy Study of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Treated with Mdc-Hly. *Microscopy and Microanalysis*, 21(2), 351-357.

Luna, E. J. D. A., & Silva Junior, J. B. D. (2013). Doenças transmissíveis, endemias, epidemias e pandemias. *A saúde no Brasil em 2030: prospecção estratégica do sistema de saúde brasileiro*.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P.; tradução: Maranhão, A.Q., Lima, B. D., & Kyaw, C. M. (2010) Capítulos 14, 15, 16 e 27. In: *Microbiologia de Brock*. 12a. Edição. Porto Alegre: Artmed, 2010. pp. 367-486, 779-810.

Majeed, H., Liu, F., Hategekimana, J., Sharif, H. R., Qi, J., Ali, B., ... & Zhong, F. (2016). Bactericidal action mechanism of negatively charged food grade clove oil nanoemulsions. *Food chemistry*, 197, 75-83.

Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B., & Graves, S. M. (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18(41), R635–R666.

Masso-Silva, J. A., & Diamond, G. (2014). Antimicrobial peptides from fish. *Pharmaceuticals*, 7(3), 265-310.

de Matos Gomes, N., de Moraes Rezende, C., Fontes, S. P., Hovell, A. M. C., Landgraf, R. G., Matheus, M. E., ... & Fernandes, P. D. (2008). Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. *Journal of ethnopharmacology*, 119(1), 179-184.

de Matos Gomes, N., de Rezende, C. M., Fontes, S. P., Matheus, M. E., da Cunha Pinto, A., & Fernandes, P. D. (2010). Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. *Journal of ethnopharmacology*, 128(1), 177-183.

McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8(6), 1719–1729.

Mejía, C., Zurita, J., & Guzmán-Blanco, M. (2010). Epidemiologia e vigilância de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. *Braz J Infect Dis*, 14, S79-86.

Mimica, M. J., & Berezin, E. N. (2018). *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina: um problema emergente. *Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo*, 51(2), 52-56.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, & Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. (2010). Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. (2017). Boletim epidemiológico - Sífilis 2017. Vol. 48. No 36. Disponível em: < <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/13/BE-2017-038-Boletim-Sifilis-11-2017-publicacao-.pdf> >. Acessado em: 31 Jan 2019.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. DASIS. (2018a). Série histórica do número de casos novos de tuberculose. Brasil, Regiões e Unidades Federadas de residência por ano diagnóstico (1990 a 2017). Disponível em: < <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/dezembro/27/Casos-novos-tuberculose-1990-2017-base-OUT-2018.pdf> >. Acessado em: 31 Jan 2019.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. DASIS. (2018b). Série Histórica do Número de Mortes por Tuberculose. Brasil, Regiões e Unidades Federadas de residência por ano do óbito (2001 a 2017). Disponível em: < <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/dezembro/27/Numero-de-mortes-por-tuberculose-2001-2017-OUT-2018.pdf> >. Acessado em: 31 Jan 2019.

Ministério da Saúde (BR). Sistema de Informação de Agravos de Notificação (2018c). Casos confirmados de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2018. Disponível em: < <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/agosto/06/caso-fmb-atualiza---o-sit-e-01.08.2018.pdf> >. Acessado em: 31 Jan 2019.

Moghimi, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A., & McClements, D. J. (2016). Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food chemistry*, 194, 410-415.

Moyes, R. B., Reynolds, J., & Breakwell, D. P. (2009). Differential staining of bacteria: gram stain. *Current protocols in microbiology*, 15(1), A-3C.

Mutlu-Ingok, A., & Karbancioglu-Guler, F. (2017). Cardamom, Cumin, and Dill Weed Essential Oils: Chemical Compositions, Antimicrobial Activities, and Mechanisms of Action against *Campylobacter* spp. *Molecules*, 22(7), 1191.

Navarri, M., Jégou, C., Meslet-Cladière, L., Brillet, B., Barbier, G., Burgaud, G., & Fleury, Y. (2016). Deep seafloor fungi as an untapped reservoir of amphipathic antimicrobial compounds. *Marine drugs*, 14(3), 50.

Organização Mundial da Saúde (OMS). (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1)>.

Acesso em: 12 de dezembro de 2016.

Organização Mundial da Saúde (OMS). (2016). Antimicrobial resistance. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>>. Acesso em: 12 de dezembro de 2016.

Organização Mundial da Saúde (OMS). (2017). Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016-2017. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259744/9789241513449-eng.pdf;jsession>

[nid=9A95C0E48DA0E3516B357AF74A055E99?sequence=1](https://doi.org/10.1016/j.ambx.2019.01.001) >. Acessado em: 01 Fev 2019.

Organização Mundial da Saúde. (2018). Delivering quality health services: a global imperative for universal health coverage.

Omura, S. (Ed.). (2002). *Macrolide antibiotics: chemistry, biology, and practice*. 2a. Edição. San Diego, EUA: Elsevier. 640 p.

Ottoni, C. A., Simões, M. F., Fernandes, S., Dos Santos, J. G., Da Silva, E. S., de Souza, R. F. B., & Maiorano, A. E. (2017). Screening of filamentous fungi for antimicrobial silver nanoparticles synthesis. *AMB Express*, 7(1), 31.

Paiva, L. A. F., de Alencar Cunha, K. M., Santos, F. A., Gramosa, N. V., Silveira, E. R., & Rao, V. S. N. (2002). Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 16(8), 737-739.

Peng, K., Kong, Y., Zhai, L., Wu, X., Jia, P., Liu, J., & Yu, H. (2010). Two novel antimicrobial peptides from centipede venoms. *Toxicon*, 55(2-3), 274-279.

Pieri, F. A., Mussi, M. C. M., Fiorini, J. E., Moreira, M. A. S., & Schneedorf, J. M. (2012). Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. *Brazilian dental journal*, 23(1), 36-38.

Prabhu, S., & Poulouse, E. K. (2012). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International nano letters*, 2(1), 32.

Programa REFLORA. Exsicata de um exemplar de *Copaifera officinalis*. Disponível em: <<http://reflora.cria.org.br/inct/exsicatae/504147452f5354594c452f494e43542f4c414e472f70742f464f524d41542f73686f77636173652f584d4c2f533537363231353438323631331392f434f4c4c454354494f4e2f494e50412f494e495449414c494d41474549442f37343132383332362f53484f572f>>. Acessada em: 05 Jan 2019.

Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., & Zou, X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate research*, 339(16), 2693-2700.

Queiroz, L.P.; Martins-da-Silva, R.C.V.; Costa, J. (2015) *Copaifera* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22895>>. Acessado em: 01 Fev 2019.

Rane, S. S., & Choi, P. (2005). Polydispersity index: how accurately does it measure the breadth of the molecular weight distribution?. *Chemistry of materials*, 17(4), 926-926.

Rao, J., Chen, B., & McClements, D. J. (2019). Improving the Efficacy of Essential Oils as Antimicrobials in Foods: Mechanisms of Action. *Annual review of food science and technology*, 10.

Rivero-Cruz, B. E., Esturau, N., Sánchez-Nieto, S., Romero, I., Castillo-Juárez, I., & Rivero-Cruz, J. F. (2011). Isolation of the new anacardic acid 6-[16' Z-nonadecenyl]-salicylic acid and evaluation of its antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Natural product research*, 25(13), 1282-1287.



Rodrigues, E. D. C., Ferreira, A. M., Vilhena, J. C., Almeida, F. B., Cruz, R. A., Florentino, A. C., ... & Fernandes, C. P. (2014). Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (*Copaifera duckei*) oleoresin. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(6), 699-705.

Roduner, E. (2006). Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews*, 35(7), 583-592.

Rossi, F., García, P., Ronzon, B., Curcio, D., & Dowzicky, M. J. (2008). Rates of antimicrobial resistance in Latin America (2004-2007) and in vitro activity of the glycylicycline tigecycline and of other antibiotics. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12(5), 405-415.

Rossi, F., Diaz, L., Wollam, A., Panesso, D., Zhou, Y., Rincon, S., ... & Tran, T. T. (2014). Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *New England Journal of Medicine*, 370(16), 1524-1531.

SAMPAIO, Marina Carvalho. Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões à base de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) para avaliação de efeitos biológicos em células de câncer de mama in vitro. 2017. xv, 72 f., il. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia)—Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

Santos, A. O. D., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., Veiga Junior, V. F., Pinto, A. C., & Nakamura, C. V. (2008). Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(3), 277-281.

Santos, R. C. V., dos Santos Alves, C. F., Schneider, T., Lopes, L. Q. S., Aurich, C., Giongo, J. L., ... & de Almeida Vaucher, R. (2012). Antimicrobial activity of Amazonian oils against Paenibacillus species. *Journal of invertebrate pathology*, 109(3), 265-268.

dos Santos, E. C. G., Donnici, C. L., da Silva Camargos, E. R., de Rezende, A. A., de Aguiar Andrade, E. H., Soares, L. A. L., ... & das Graças Almeida, M. (2013). Effects of *Copaifera duckei* Dwyer oleoresin on the cell wall and cell division of *Bacillus cereus*. *Journal of medical microbiology*, 62(7), 1032-1037.

Saranya, S., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. M. I. T. A. V. A. (2012). Antibacterial activity of eucalyptus oil nanoemulsion against *Proteus mirabilis*. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(3), 668-671.

Schaming, D., & Remita, H. (2015). Nanotechnology: from the ancient time to nowadays. *Foundations of Chemistry*, 17(3), 187-205.

Silveira, C. S., Pessanha, C. M., Lourenço, M. C. S., Neves Júnior, I., Menezes, F. S., & Kaplan, M. A. C. (2005). Antimicrobial activity of *Syagrus oleracea* and *Mauritia vinifera* fruits. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(2), 143-148.

de Souza, G. A., da Silva, N. C., de Souza, J., de Oliveira, K. R., da Fonseca, A. L., Baratto, L. C., ... & Moraes, W. P. (2017). In vitro and in vivo antimalarial potential of oleoresin obtained from *Copaifera reticulata* Ducke (Fabaceae) in the Brazilian Amazon rainforest. *Phytomedicine*, 24, 111-118.

Stasiuk, M., & Kozubek, A. (2010). Biological activity of phenolic lipids. *Cellular and Molecular life sciences*, 67(6), 841-860.

Sumi, C. D., Yang, B. W., Yeo, I. C., & Hahm, Y. T. (2014). Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Canadian journal of microbiology*, 61(2), 93-103.

Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., & Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in colloid and interface science*, 108, 303-318.

Taniguchi, N., ARAKAWA, C., & KOBAYASHI, T. (1974). On the basic concept of 'nano-technology'. In *Proceedings of the International Conference on Production Engineering, 1974-8*(Vol. 2, pp. 18-23). 一般社団法人日本機械学会.

Tomer, A., Harker, L. A., & Burstein, S. A. (1988). Flow cytometric analysis of normal human megakaryocytes. *Blood*, 71(5), 1244-1252.

Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, 28(3), 603-661.

Tratnyek, P. G., Reilkoff, T. E., Lemon, A. W., Scherer, M. M., Balko, B. A., Feik, L. M., & Henegar, B. D. (2001). Visualizing redox chemistry: probing environmental oxidation–reduction reactions with indicator dyes. *The Chemical Educator*, 6(3), 172-179.

Wang, J., Soisson, S. M., Young, K., Shoop, W., Kodali, S., Galgoci, A., ... & Ha, S. (2006). Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature*, 441(7091), 358.

Weckesser, S., Engel, K., Simon-Haarhaus, B., Wittmer, A., Pelz, K., & Schempp, C. M. (2007). Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*, *14*(7-8), 508-516.

Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(12), 4576-4579.

Zengin, H., & Baysal, A. H. (2014). Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules*, *19*(11), 17773-17798.