

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE - UNICENTRO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

DAIANE CRISTINE MIRANTE

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE MICROPARTÍCULAS DE POLILISINA E DE
NANOCÁPSULAS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *MELALEUCA
ALTERNIFOLIA* CHEEL (MYRTACEAE)**

PONTA GROSSA

2015

DAIANE CRISTINE MIRANTE

**Desenvolvimento Tecnológico e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de
Micropartículas de Polilisina e de Nanocápsulas contendo óleo essencial de
Melaleuca Alternifolia Cheel (Myrtaceae)**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial de avaliação para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Desenvolvimento e controle de fármacos, medicamentos e correlatos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Josiane Padilha de Paula.

PONTA GROSSA

2015

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor Tratamento da Informação BICEN/UEPG

M672	Mirante, Daiane Cristine Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antimicrobiana de micropartículas de polilisina e de nanocápsulas contendo óleo essencial de <i>Melaleuca Alternifolia</i> Cheel (Myrtaceae)/ Daiane Cristine Mirante. Ponta Grossa, 2015. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual de Ponta Grossa. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Josiane Padilha de Paula. 1. ϵ-poli-L-lisina. 2. Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>. 3. Micropartículas. 4. Nanocápsulas. 5. Atividade antimicrobiana. I. Paula, Josiane Padilha de. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. CDD : 615.321
------	---



Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Ata nº. 08/2015

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO, DA PÓS-GRADUANDA DAIANE CRISTINE MIRANTE, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, REALIZADA NO DIA 27 DE FEVEREIRO DE 2015, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Ao vigésimo sétimo dia do mês de fevereiro de dois mil e quinze, às 14h00min, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Sala M 115 da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência da Profa. Dra. Josiane de Fátima Padilha de Paula, em sessão pública, reuniu-se a banca examinadora para a defesa de dissertação da pós-graduanda Daiane Cristine Mirante. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia. Linha de Pesquisa: Desenvolvimento e controle de fármacos, medicamentos e correlatos. A banca foi constituída pelos pesquisadores: Profa. Dra. Josiane de Fátima Padilha de Paula (Presidente) / UEPG, Profa. Dra. Patrícia Mathias Döll Boscardin / UEPG e Profa. Dra. Daniela Florencio Maluf / UTP, indicados pelo egrégio colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – nível de Mestrado Acadêmico, desta Universidade, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem a defesa de dissertação e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para a arguição. O trabalho analisado foi **“Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antimicrobiana de micropartículas de polilisina e de nanocápsulas contendo óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia* Cheel (Myrtaceae)”**. Encerrada a defesa de dissertação, procedeu-se o julgamento, tendo sido a candidata APROVADA (Aprovada/Reprovada). Foi dada ciência à mestranda que, de acordo com o Art. 34 do Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UNICENTRO/UEPG, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, o aluno tem o prazo de 30 (trinta) dias após esta defesa para entregar as cópias da versão definitiva, que devem ser aprovadas pelo orientador e homologadas pelo Colegiado de curso. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se à presente ata que vai assinada pelos membros da banca examinadora e por mim, Jessica Leme Cano, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela UEPG.

Ponta Grossa, 27 de fevereiro de 2015

Observação (se necessária): _____

Profa. Dra. Josiane de Fátima Padilha de Paula – UEPG

Profa. Dra. Patrícia Mathias Döll Boscardin – UEPG

Profa. Dra. Daniela Florencio Maluf – UTP

“Se você tem a coragem de deixar para trás tudo que lhe é familiar e confortável e embarcar numa jornada em busca da verdade, e se você tem mesmo a vontade de considerar tudo o que acontece nessa jornada como uma pista, e se você aceitar cada um que encontrar no caminho como professor, e se estiver preparada, acima de tudo, para encarar (e perdoar) algumas realidades bem difíceis sobre você mesma...então a verdade não lhe será negada.”

Elizabeth Gilbert

AGRADECIMENTOS

Sei que um trabalho de pesquisa não se faz sozinho, por isso tenho tantas pessoas a agradecer, pois foram muitas que me ajudaram nessa caminhada de 2 anos. Algumas foram importantes para o desenvolvimento do projeto, outras apenas pelo colo amigo nos momentos difíceis.

Agradeço a Deus por ser meu refúgio e força, por me manter sempre confiante e acreditando que tudo daria certo.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Josiane de Fátima Padilha de Paula pela oportunidade que me foi dada em realizar este trabalho, pelo apoio nos momentos necessários.

Aos meus amados pais, Wanderlei e Rozangela, por me darem segurança, por sempre estarem ao meu lado e acima de tudo pela paciência por me aturarem nos meus dias de mau humor.

Aos meus irmãos Mayara e Eduardo, por tornarem meus dias sempre melhores.

Ao querido e confiante Luís Alberto Gomes, por aguentar minhas incertezas, inseguranças, o meu cansaço, e principalmente minha ausência, mas manteve-se ali, firme e forte, me apoiando sempre.

Ao Prof^o Dr^o Flávio Luís Beltrame pelo apoio e colaboração no desenvolvimento da validação do método analítico, pelas contribuições durante a banca de qualificação, por ter sido um amigo no momento que necessitei.

À Prof^a Dr^a Patrícia pelos conselhos, pelas palavras sempre de incentivo. Agradeço pela valiosa contribuição dada diariamente e quando participou como banca de qualificação e de defesa desta dissertação.

Ao Prof^o Dr^o Paulo Vitor Farago pelo conhecimento transmitido sempre que busquei ajuda.

Ao Prof^o Dr^o Adilson, pela paciência e perseverança em realizar as minhas imagens de microscopia.

À Prof^a Dr^a Jacqueline Marques pelos anos de convivência, pela disposição em sempre ajudar e por ser meu exemplo de profissional.

As minhas amigas Mona Lisa Simionatto Gomes, Bruna Carletto, Juliane Souza, Suellen Mendes e Jaqueline Carneiro, pelo companheirismo e afeto nessa caminhada.

À minha amiga de longa data Josiane Souza, pelos conselhos, pelo colo amigo, pelos cafés no fim de tarde.

Ao meu casal de amigos Deize e Denilson, por dividirem comigo momentos especiais, pelo apoio e confiança.

Aos funcionários e aos técnicos dos laboratórios, que sempre me ajudaram com maior carinho.

Ao pessoal do mestrado de Bioenergia, Prof^a Dr^a Maria Elena, ao aluno de iniciação Lucas e a técnica Cristina pelo auxílio na análise de cromatografia gasosa.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

À todos os que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento do presente trabalho, meu muito obrigada.

RESUMO

O desenvolvimento de agentes antimicrobianos representa um dos mais importantes avanços na área terapêutica, devido à resistência microbiana acarretar problemas para a saúde pública, com sérias implicações econômicas, sociais e políticas. Visto isso, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento tecnológico de micropartículas do biopolímero ϵ -poli-L-Lisina (ϵ -PLL) e de nanocápsulas poliméricas contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel, revestidas ou não ϵ -PLL. As micropartículas foram obtidas pela técnica de secagem por aspersão com rendimento de 42,4 %. As nanocápsulas foram preparadas pela técnica de deposição interfacial de um polímero pré-formado. As nanocápsulas apresentaram diâmetro médio nanométrico (160-200 nm), índice de polidispersão inferior a 0,25 e potencial zeta negativo para as nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (-39,8 mV) e positivo para as nanocápsulas de ϵ -PLL (+17,75 mV), demonstrando que houve o processo de adsorção por interação eletrostática entre a PCL e a ϵ -PLL. Foi desenvolvido e validado um método analítico por espectrofotometria de UV-Vis com a finalidade de permitir uma determinação confiável da eficiência de encapsulação (EE). Este método apresentou especificidade, linearidade, precisão, limites de detecção e quantificação satisfatórios de acordo com as recomendações vigentes. A EE foi de 99,86%. Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos sistemas micro e nanoencapsulados contendo ϵ -PLL contra os micro-organismos *E. coli*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Os resultados demonstram que a incorporação do óleo essencial de *M. alternifolia* no sistema nanoestruturado desenvolvido foi capaz de aumentar a sua atividade antibacteriana. As micropartículas e as nanocápsulas, podem futuramente ser agentes antimicrobianos promissores, promovendo o desenvolvimento de uma alternativa terapêutica eficaz com doses menores e mais efetivas.

Palavras-chave: ϵ -poli-L-lisina; óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*; micropartículas, nanocápsulas; atividade antimicrobiana

ABSTRACT

The development of antimicrobial agents is one of the most important advances in the therapeutic area due to microbial resistance, causing problems to public health, with serious economic, social and political implications. Thus, this study aimed to the technological development of microparticles of biopolymer ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PLL) and polymeric nanocapsules containing essential oil of *Melaleuca alternifolia* Cheel uncoated or coated with ϵ -PLL. The microparticles were obtained by the spray drying technique with a yield of 42.4%. The nanocapsules were prepared by interfacial deposition technique of a preformed polymer. The nanocapsules showed average nanometer diameter (160-200 nm), polydispersity index of less than 0.25 and negative zeta potential for nanocapsules poly(ϵ -caprolactone) (PCL) (-39.8 mV) and positive for the nanocapsules of ϵ -PLL (+17, 75 mV), indicating that there was an electrostatic adsorption interaction between PCL and ϵ -PLL. An analytical method was developed and validated by UV-vis spectrophotometry in order to enable a reliable determination of encapsulation efficiency (EE). This method showed specificity, linearity, precision, detection and quantification satisfactory limits according to current recommendations. The EE was 99.86%. The antimicrobial activity of micro systems and nanocapsules was evaluated, containing ϵ -PLL against the microorganisms, *E. coli*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. The results demonstrate that the incorporation of the essential oil of *M. alternifolia* in the nanostructured system developed has been able to increase their antibacterial activity. The microparticles and nanocapsules, can, in the future, be promising antimicrobial agents, promoting the development of an effective therapeutic alternative and more effective at lower doses.

Keywords: ϵ -poly-L-lysine; essential oil of *Melaleuca alternifolia*; microparticles; nanocapsules; antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas	24
Figura 2: Estruturas químicas: α -PLL(a) e ε -PLL (b)	28
Figura 3: Estrutura química da PCL	31
Figura 4: Estrutura química dos principais componentes do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	33
Figura 5: Método de preparo das suspensões de nanocápsulas poliméricas	41
Figura 6: Potencial Zeta da solução de micropartículas de ε -PLL	49
Figura 7: Diâmetro médio de partícula para as suspensões NC-1 (A) e NC-2 (B)	52
Figura 8: Diâmetro médio de partícula, após a preparação e após 60 dias para as suspensões de nanocápsulas	55
Figura 9: Índice de polidispersão, após a preparação e após 60 dias para as suspensões de nanocápsulas	56
Figura 10: Valores de pH, após a preparação e após 60 dias para as suspensões de nanocápsulas	56
Figura 11: Potencial zeta, após a preparação e após 60 dias para as suspensões de nanocápsulas	57
Figura 12: Aspectos morfológicos da PCL (A), da ε -PLL (B) e das micropartículas de ε -PLL (C)	58
Figura 13: Aspectos morfológicos das suspensões de nanocápsulas NC-0 (A) e NC-1 (B)	59
Figura 14: Sequência de fotomicrografias (A-F) das interações das nanocápsulas revestidas com ε -PLL com feixe de elétrons	60

Figura 15: Figuras de difração de raios X da PCL (A), da ϵ -PLL (B), micropartículas de ϵ -PLL (C), NC-0 (D), NC-1 (E), NC-2 (F), NC-3 (G)	62
Figura 16: Espectro de IVTF do polímero PCL.....	64
Figura 17: Espectro de IVTF do polímero ϵ -PLL	64
Figura 18: Espectro de IVTF do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	65
Figura 19: Espectro de IVTF das suspensões de nanocápsulas NC-0 (A), NC-1 (B), NC-2 (C), NC-3 (D) e micropartículas de ϵ -PLL (E).....	66
Figura 20: Cromatograma do terpinen-4-ol	67
Figura 21: Cromatograma do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	67
Figura 22: Espectro de absorção UV-Vis óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	68
Figura 23: Curva analítica óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> em etanol em 204 nm ..	69
Figura 24: Espectro de absorção UV-vis da suspensão NC-1 (A) e NC-0 (B).....	71
Figura 25: Preparação das microplacas e leitura após aplicação do TTC	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção de ϵ -PLL por micro-organismos	29
Tabela 2: Composição do óleo essencial de <i>M.alternifolia</i>	34
Tabela 3: Composição das nanocápsulas poliméricas contendo óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> revestidas ou não com ϵ -PLL	42
Tabela 4: Faixa de concentração usada no teste de CIM	47
Tabela 5: Características físico-químicas de nanocápsulas revestidas com diferentes concentrações de ϵ -PLL	50
Tabela 6: Características físico-químicas das nanocápsulas contendo óleo essencial de <i>M.alternifolia</i> revestidas ou não com ϵ -PLL	51
Tabela 7: Características físico-químicas das nanocápsulas contendo óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> revestidas ou não com ϵ -PLL após 60 dias.....	54
Tabela 8: Valores experimentais obtidos nos ensaios de repetitividade e precisão intermediária.....	70
Tabela 9: Concentração Inibitória Mínima (CIM)	73
Tabela 10: Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	74

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B.H.I	Infusão cérebro coração
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CQs	Controles de qualidade
CV	Coeficiente de variação
DCC	N,N'-díciclohexilcarbodiimida
DM	Diâmetro médio
DP	Desvio padrão
EDC	1-etil-3-(-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EE	Eficiência de encapsulação
FEG	Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo
g.L ⁻¹	Grama por litro
h	Horas
ICH	<i>Internacional Conference on Harmonization</i>
IPD	Índice de polidispersão
ISO	<i>International Standard Organization</i>
IVTF	Infravermelho com transformada de Fourier
KBr	Brometo de potássio
kV	Quilovolts
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
mA	Miliampère
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MDR-TB	Tuberculose multirresistente
min	Minutos
mg	Miligrama
mV	Milivolts
$\overline{M_w}$	Massa molar ponderada

NC-0	Nanocápsula controle
NC-1	Nanocápsula de óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>
NC-2	Nanocápsula de óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> revestida com ϵ -PLL
NC-3	Nanocápsula controle revestida com ϵ -PLL
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
nm	nanômetro
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PEG	Polietilenoglicol
PGA	Poli(ácido glicólico)
pH	Potencial hidrogeniônico
PLGA	Poli(ácido-lático-co-ácidoglicólico)
ϵ -PLL	ϵ -poli-L-lisina
α - PLL	α - poli-L-lisina
PZ	Potencial zeta
r	Coeficiente de correlação
S	<i>Slope</i>
Span 80®	Monooleato de sorbitano
TB	Tuberculose
Tf	Temperatura de fusão
Tg	Temperatura de transição vítrea
TTC	Cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio
Tween 80®	Polissorbato 80
UFC	Unidade formadora de colônia
v/v	Volume por volume
λ	Comprimento de onda
μ g	Micrograma
μ m	Micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Terapia antimicrobiana.....	18
2.2 Nanotecnologia Farmacêutica	19
2.2.1 Micropartículas poliméricas.....	20
2.2.1.1 Secagem por aspersão (<i>spray drying</i>)	21
2.2.2 Nanopartículas poliméricas	22
2.2.2.1 Sistemas nanoestruturados e antimicrobianos.....	26
2.3 Polímeros biodegradáveis	27
2.3.1 ϵ-poli-L-lisina (ϵ-PLL)	27
2.3.2 Poli (ϵ-caprolactona) (PCL)	30
2.4 Óleos essenciais como fase oleosa em sistemas particulados	31
2.4.1 Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel (Myrtaceae)	32
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo Geral.....	37
3.2 Objetivos Específicos.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Equipamentos	38
4.2 Reagentes e solventes	38
4.3 Materiais	39
4.4 Micro-organismos	39
4.5 Procedimentos experimentais	39
4.5.1 Obtenção de micropartículas de ϵ -PLL	39
4.5.2 Rendimento das micropartículas.....	40
4.5.3 Caracterização físico química das micropartículas de ϵ -PLL	40
4.5.3.1 Determinação do pH	40

4.5.3.2 Determinação do potencial zeta	40
4.5.4 Obtenção das suspensões de nanocápsulas poliméricas	40
4.5.5 Caracterização físico-química das suspensões das nanocápsulas poliméricas	43
4.5.5.1 Determinação do pH	43
4.5.5.2 Determinação do diâmetro médio e potencial zeta.....	43
4.5.6 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	43
4.5.7 Análise por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FEG).....	43
4.5.8 Análise por difração de raios X.....	44
4.5.9 Avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)	44
4.5.10 Identificação e quantificação do terpinen-4-ol no óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> por cromatografia gasosa	44
4.5.11 Determinação do comprimento de onda (λ) de máxima absorção do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	45
4.5.12 Validação do método analítico para a quantificação do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	45
4.5.13 Determinação da eficiência de encapsulação do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> nas suspensões de nanocápsulas	46
4.5.14 Atividade antimicrobiana	46
4.5.14.1 Padronização das suspensões bacterianas	47
4.5.14.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	47
4.5.14.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	48
4.5.15 Análise estatística do estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Obtenção e caracterização físico-química das micropartículas ε -PLL	49

5.2 Preparação e caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo óleo de essencial <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel revestidas ou não ϵ -PLL.....	49
5.2.1 Estudos de estabilidade das suspensões de nanocápsulas.....	57
5.3 Análises morfológicas e de superfície.....	58
5.4 Avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.....	63
5.5 Identificação e quantificação do terpinen-4-ol no óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> por cromatografia gasosa.....	66
5.6 Determinação do comprimento de onda (λ) de máxima absorção do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	68
5.7 Validação do método analítico por espectroscopia UV-Vis para quantificação do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	69
5.8 Determinação da eficiência de encapsulação do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> nas suspensões de nanocápsulas	71
5.9 Avaliação da atividade antimicrobiana	72
6 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

A busca por terapias alternativas para agentes antimicrobianos vem ganhando importância no cenário da saúde. Esta busca se deve ao fato das terapias convencionais apresentarem muitas vezes, efeitos adversos severos, além do desenvolvimento da resistência microbiana frente aos mais variados fármacos (ANTUNES et al., 2006).

O desenvolvimento de fármacos nas últimas décadas, representa um dos mais importantes avanços na área terapêutica. São conhecidas aproximadamente oito mil substâncias com esta atividade, porém pouquíssimas são efetivamente aproveitadas e utilizadas por não atenderem aos requisitos mínimos necessários para seu emprego terapêutico (RANG et al., 2004). Diante desta problemática, as pesquisas buscam novos agentes que sejam eficazes ante os patógenos emergentes, avaliando a sua atividade e comparando-os com antimicrobianos mais antigos.

Dentre essas novas substâncias, destacam-se as nanopartículas poliméricas e outros carreadores coloidais. Devido ao tamanho diminuído das partículas e por apresentarem capacidade de carrear o fármaco mais próximo do alvo de ação ou mesmo intracelularmente, aumentam o efeito antimicrobiano sobre alguns micro-organismos. De modo geral, as nanopartículas associadas a antimicrobianos promovem uma melhora nos índices terapêuticos, reduzem a toxicidade local, não havendo perda da eficácia de ação quando comparadas com as formas farmacêuticas atuais (MOHAMMADI et al., 2011).

Neste contexto, os poli(aminoácidos), como a ϵ -poli-L-lisina (ϵ -PLL), mostram-se importantes para a liberação de fármacos. Os poli(aminoácidos), sofrem degradação enzimática no organismo, sendo considerados seguros (OYARZUN-AMPUERO et al., 2011). Os óleos essenciais por outro lado, mostram-se eficientes como fase oleosa de nanocápsulas, por possuírem propriedades importantes como atividades antioxidante, antimicrobiana e antifúngica (SACCHETTI et al., 2005; HOSSEINI et al., 2013). Dessa forma, o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel (MYRTACEAE) apresenta características desejáveis a um agente antimicrobiano, sendo incorporado como antimicrobiano principal ou como um conservante natural em muitos produtos farmacêuticos e cosméticos destinados ao uso tópico (COX et al., 2000).

Dessa forma, considerando a necessidade de novos agentes antimicrobianos, este trabalho teve como objetivo principal desenvolver e caracterizar micropartículas de ϵ -PLL e nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*, revestidas ou não com o biopolímero ϵ -PLL e avaliar a atividade antimicrobiana e antifúngica desta associação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Terapia antimicrobiana

Considerado um problema de relevância mundial, a resistência microbiana tem sido uma grande preocupação para a saúde pública com sérias implicações econômicas, sociais e políticas. Esta problemática acaba solicitando a inclusão de outros tipos de terapias e agentes antimicrobianos, fazendo com que se busquem novos fármacos, e que estes sejam mais eficazes, abrindo assim, caminhos para a evolução das pesquisas nesta área (DELLIT et al., 2007)

Para tratar infecções causadas por micro-organismos patogênicos, utilizam-se fármacos, que tem como principal característica a habilidade de inibir o crescimento de micro-organismos, quando utilizados em concentrações toleradas pelo hospedeiro (KAYE et al., 2001). Os inconvenientes dos fármacos convencionais é o desenvolvimento da resistência e também efeitos secundários adversos. A resistência aos fármacos impõe a administração de altas doses, muitas vezes gerando toxicidade intolerável (HAJIPOUR et al., 2012).

O uso amplamente disseminado dos antimicrobianos tem levado à seleção de organismos altamente resistentes, que subsequentemente impõem riscos ao paciente e à comunidade (PATERSON et al., 2001). Essas cepas resistentes contribuem para o surgimento de doenças que estavam sob controle por muitos anos. Em 1950, oito anos após a introdução da penicilina, 68% dos casos de infecção causada por *Staphylococcus aureus* já apresentavam resistência a esse antibiótico (ROSSI; ANDREAZZI, 2006). Outro exemplo de resistência, são as cepas bacterianas que causam a tuberculose (TB) as quais são resistentes ao tratamento antibacteriano anteriormente eficaz. Estima-se que quase meio milhão de novos casos de tuberculose multirresistente (MDR-TB) ocorrem no mundo a cada ano (HAJIPOUR et al., 2012).

Vários são os mecanismos que os micro-organismos apresentam para desenvolver resistência aos fármacos, sendo esses fatores intrínsecos ou extrínsecos. Estratégias preventivas na disseminação da resistência são fundamentais, e devem ser aplicadas. Uma das estratégias é saber como o fármaco rompe a parede celular causando a morte desse micro-organismo. A parede celular bacteriana tem a função de proteger a célula contra rupturas osmóticas e danos mecânicos. De acordo com a sua estrutura, componentes e funções, pode ser dividida em duas categorias

principais: Gram positivas e Gram negativas. As bactérias Gram positivas possuem uma parede espessa de peptidoglicano, que está ligado aos ácidos teicoicos. Em contraste, as bactérias Gram negativas possuem uma parede celular mais complexa, tanto estruturalmente, quanto quimicamente. Mais especificamente, a parede celular compreende uma camada fina de peptidoglicano e contém uma membrana externa, que cobre a superfície da membrana citoplasmática (HAJIPOUR et al., 2012).

A determinação da suscetibilidade *in vitro* de bactérias isoladas costuma ser realizada com o intuito de garantir que o regime antimicrobiano empírico seja ideal. A disponibilização dos dados no tempo devido permite ajustar, quando apropriado, este regime. Entretanto, a suscetibilidade de certos micro-organismos ao fármaco de escolha tem sido tão uniforme que a realização rotineira de testes *in vitro* é desnecessária (KAYE et al., 2001). A difusão em disco constitui o método classicamente empregado no teste da suscetibilidade antimicrobiana, embora já existam sistemas mais automatizados disponíveis. Quando necessário, os organismos podem ser testados com o uso de técnicas de diluição em tubo de ensaio ou microdiluições para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima. As técnicas mais modernas incluem o método do gradiente de difusão e diversos ensaios baseados em ácidos nucleicos, que são capazes de detectar genes promotores de resistência antimicrobiana em bactérias (HASSELMANN, 2003).

O uso extensivo de agentes antimicrobianos, especialmente em unidades de terapia intensiva e outras instalações de assistência médica, favorece fortemente a seleção de espécies microbianas resistentes, em particular cepas bacterianas que abrigam plasmídeos promotores de resistência transmissível (KOLLEF; FRASER, 2001). O controle da resistência depende da adoção de medidas locais, devido ao fato do desenvolvimento de novos fármacos ser baixo e não conseguir acompanhar o ritmo da emergência de farmacoresistência (LEEKHA; TERRELL; EDSON, 2011).

2.2 Nanotecnologia Farmacêutica

A constante busca pela utilização de formulações que permitam a otimização da velocidade e a dosagem dos fármacos, tem sido um desafio entre pesquisadores e a indústria farmacêutica. O desenvolvimento de sistemas micro ou nanoparticulados associados a antimicrobianos tem recebido atenção especial devido a melhora nos

índices terapêuticos, reduzindo a toxicidade local sem perda da eficácia de ação quando comparadas com as formas farmacêuticas atuais (MOHAMMADI et al., 2011). Aplicações da nanotecnologia para melhorar a eficácia dos antimicrobianos têm sido relatadas em vários estudos.

A nanotecnologia farmacêutica é a área envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica (SAKATA et al., 2007).

Os sistemas utilizados para esse fim podem ser de natureza diversa, tendo como prioridade a vetorização do fármaco, ou seja, a liberação do fármaco de forma preferencial no órgão ou célula-alvo, permitindo, deste modo, acentuar o efeito farmacológico e reduzir os efeitos colaterais e adversos (NECKEL; LEMOS-SENNA, 2005). Dentre as principais estratégias vetoriais incluem-se os sistemas nanoestruturados e microestruturados, sendo estes, veículos de interesse tanto para a administração intravenosa de fármacos lipofílicos, como também para administração via oral e cutânea (SCHAFFAZICK et al., 2003a; MAINARDES; GREMIÃO; EVANGELISTA, 2006).

A descoberta dos lipossomas veio aumentar a variedade de ferramentas para o desenvolvimento da nanotecnologia farmacêutica (LASIC, 1998). Esses sistemas serviram de base para a explosão de um grande número de nanodispositivos adequados à liberação de fármacos produzidos na sua grande maioria a partir de lipídios ou de compostos poliméricos (COUVREY; VAUTHIER, 2006).

2.2.1 Micropartículas poliméricas

Micropartículas são sistemas geralmente poliméricos que apresentam diâmetros na ordem de micrômetros (1 a 1000 μm), as quais podem ser classificadas quanto à sua organização em microcápsulas ou microesferas. As microcápsulas consistem em sistemas onde o núcleo está envolvido por uma camada ou filme polimérico formando um sistema do tipo reservatório. Já as microesferas, constituem um sistema matricial, no qual o polímero forma uma rede tridimensional onde o material a ser microencapsulado pode estar adsorvido, incorporado ou ligado covalentemente à matriz polimérica, formando sistemas de dissolução, dispersão ou sistemas porosos (JAFARI et al., 2008). A localização e o estado de dispersão dos

fármacos nas micropartículas poliméricas são fatores importantes que governam o modelo de liberação (KAWAGUCHI, 2000).

Em 1960, a técnica de microencapsulação começou a ser utilizada com o intuito de se obter materiais com tamanho micrométrico. A microencapsulação consiste na transformação de líquidos em pós. Atualmente, a microencapsulação é utilizada nas indústrias alimentícia, têxtil, farmacêutica e cosmética (THOMPSON, 2007; AHMAD et al., 2011). Cabe ressaltar que formas farmacêuticas multiparticuladas apresentam vantagens em relação aos sistemas unitários, dentre elas, destacam-se uma distribuição mais uniforme e rápida ao longo do trato gastrointestinal, com a redução dos danos locais, uma menor variação da biodisponibilidade, maior reprodutibilidade de doses individuais, bem como a redução do risco de toxicidade (KAWASHIMA et al., 1993).

Sistemas microparticulados podem também incrementar a solubilização e a dissolução de fármacos, permitindo a administração de fármacos incompatíveis, auxiliando a dispersão dessas substâncias insolúveis em meios aquosos, além de mascarar certas características organolépticas como sabores e odores desagradáveis (AL-OMRAN et al., 2002). Podem ainda reduzir a volatilidade, melhorar características de escoamento de pós, promover proteção contra agentes atmosféricos, como umidade, luz, calor, que causem oxidação e demais danos físico-químicos (SILVA et al., 2003).

Dentre os métodos empregados para a preparação de micropartículas pode-se mencionar: coacervação; emulsificação-evaporação do solvente; emulsificação-extração com solvente; secagem por aspersão (*spray drying*) (BENITA, 2006). Dentre estes métodos, a secagem por aspersão é a técnica mais prática, sendo um processo em etapa única, apresentando facilidade em controlar condições de operação e tendo a possibilidade de não utilizar solventes orgânicos durante o processo (RAFFIN et al., 2006).

2.2.1.1 Secagem por aspersão (*spray drying*)

A técnica de secagem por aspersão ou *spray drying* é uma tecnologia muito utilizada em diversos segmentos industriais, incluindo o farmacêutico. Embora considerado um processo de desidratação, pode ser usado para encapsulação quando o composto ativo é envolvido por uma matriz protetora, normalmente um

polímero ou material fundido (RISCH, 1995). A encapsulação por *spray drying* tem sido utilizada na indústria alimentícia desde 1950, para proporcionar aos ingredientes encapsulados proteção contra a degradação/oxidação e para converter ingredientes líquidos em pós (GOUIN, 2004).

A formulação do material a ser atomizado e os parâmetros do processo determinam as propriedades das partículas produzidas. A encapsulação conduzida em um *spray drying* envolve três etapas básicas: a preparação da dispersão ou emulsão a ser processada, homogeneização e a atomização da dispersão dentro da câmara de secagem. A solução é atomizada, quando entra em contato com uma corrente de ar quente. A água é evaporada, produzindo partículas secas de formato esférico. O produto seco resultante pode compreender pós, grânulos ou aglomerados de partículas de diversos tamanhos (RISCH, 1995).

As propriedades físicas do produto final (tamanho, forma e teor de umidade) podem ser controladas com a escolha do equipamento adequado e manipulação dos parâmetros do processo (BENITA, 2006).

Ao contrário de muitos outros métodos clássicos de preparação de micropartículas, o *spray drying* é uma técnica bastante rápida para a obtenção destes sistemas, sendo um processo de etapa única, passível de transposição de escala e aplicável a uma variedade de materiais. A rápida evaporação da água da matriz encapsulante durante a secagem faz com que o núcleo permaneça a uma temperatura abaixo de 100 °C, o que permite que o processo seja empregado até mesmo para substâncias termossensíveis (ADAMIEC; MODRZEJEWSKA, 2005; PÍSECKY, 2005; SHU et al., 2006).

Como desvantagem, apresenta a perda do produto pela adesão das partículas na parede interna do equipamento, além da possibilidade de aglomeração do sistema microparticulado (JAIN et al., 1998).

2.2.2 Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas são sistemas coloidais que variam entre 10 a 1000 nanômetros e, em geral, promovem liberação controlada e prolongada do fármaco veiculado, a partir da melhora de suas propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998; NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2010). Além das qualidades farmacológicas, as nanopartículas apresentam

vantagens como possuir grande estabilidade, permitir o carreamento de grande quantidade de fármaco, proporcionar maior controle sobre a cinética de liberação do fármaco, permitir facilmente as modificações superficiais e possuir uma multiplicidade de métodos de produção (GREF et al., 1995).

As nanopartículas podem ter diversas matrizes e serem produzidas por meio de diferentes métodos, que são baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos, a qual pode englobar reações clássicas de poliadição e policondensação (LAMBERT et al., 2000), ou, a partir da utilização de um polímero pré-formado (SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000). A polimerização interfacial de monômeros dispersos é desvantajosa por usar em sua composição polímeros não biodegradáveis e formar resíduos tóxicos durante as reações (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998). Os métodos provenientes de polímeros pré-formados são: emulsão-evaporação do solvente, difusão do solvente, emulsificação-difusão e *salting out* (REIS et al., 2006).

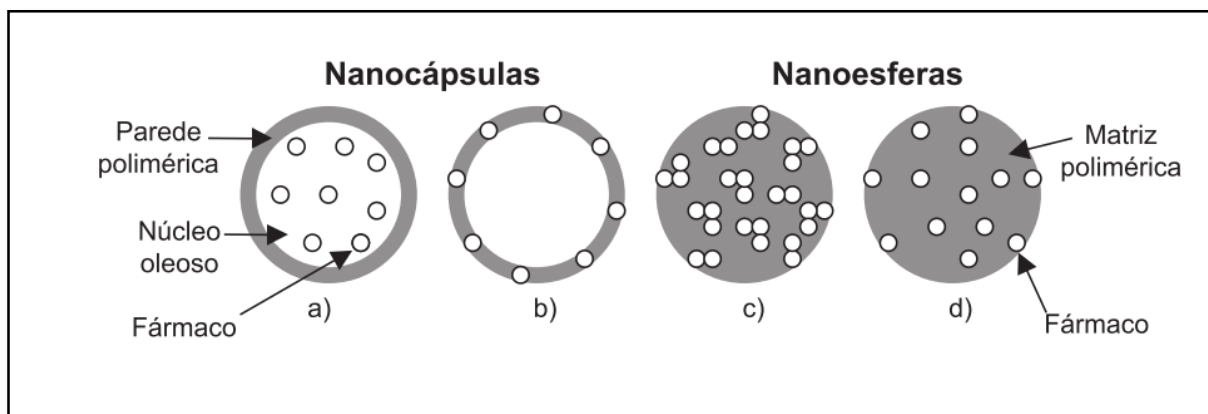
Essas técnicas são similares quanto aos procedimentos empregados, pois envolvem a preparação de uma solução orgânica contendo o polímero e o fármaco, e de uma solução aquosa contendo um estabilizante. Sua escolha deve ser feita com base nos fatores desejados, como tamanho, área de aplicação e o tipo do polímero a ser utilizado (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998). Durante o armazenamento, as nanocápsulas podem precipitar devido à agregação, independentemente do método de preparação (SCHAFFAZICK et al., 2002).

Quando se trabalha com polímeros ionizáveis a geleificação ionotrópica, é a técnica mais indicada, onde um agente reticulante é adicionado ao polímero disperso em água, organizando a cadeia polimérica em nanopartículas, que encapsularão o fármaco dissolvido ou disperso no sistema (CALVO et al., 1997a).

As nanopartículas poliméricas utilizadas para carrear fármacos podem ser divididas em dois grupos dependendo da sua composição e organização estrutural, como demonstrado na Figura 1. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico e o fármaco poderá estar presente no seu interior ou como componente deste invólucro. Em contrapartida, as nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica maciça e o fármaco poderá estar retido na superfície da matriz ou distribuído uniformemente por toda a nanopartícula (SCHAFFAZICK et al., 2003a). Se o fármaco estiver apenas na superfície da nanopartícula, ocorrerá uma liberação

rápida e se estiver encapsulado, no interior da nanoestrutura, haverá uma liberação mais prolongada.

Figura 1: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas



Fonte: retirado de SCHAFFAZICK et al., 2003a.

As principais características das nanopartículas que devem ser controladas são o tamanho das partículas, as propriedades de superfície e a liberação das substâncias farmacologicamente ativas, a fim de atingir a ação no local específico, com aprimoramento da posologia (MOHANRAJ; CHEN, 2006). Esses sistemas apresentam vantagens do ponto de vista tecnológico, como método de preparo simples com um alto teor de encapsulamento de fármacos lipofílicos (PELTONEN et al., 2004).

A adição de tensoativos é importante para redução das dimensões das nanocápsulas. Núcleos oleosos muito ácidos aumentam a degradação do polímero, enquanto óleos muito viscosos são resistentes à tensão durante a emulsificação resultando em gotículas oleosas maiores e consequentemente nanocápsulas maiores (ZHANG et al., 2011).

A superfície das nanopartículas pode ser modificada dependendo das características dos polímeros utilizados ou da incorporação de outros. Polímeros catiônicos permitem que as nanopartículas apresentem propriedades mucoadesivas. Enquanto polímeros não-iônicos são os mais biocompatíveis. Outros modificadores de superfície são os tensoativos, os quais apresentam caráter anfifílico diminuindo a tensão superficial entre partícula e célula, o que permite um maior contato entre ambas (KREUTER, 1997).

Nanopartículas revestidas por polímeros hidrofílicos permitem um tempo de circulação maior no organismo (GREF et al., 1994). Estes sistemas são estudados para fins terapêuticos para uma liberação do fármaco de uma maneira controlada a partir do local de administração até atingir o alvo terapêutico. Nesse sentido, a modificação das características superficiais das nanopartículas, seja pela adsorção ou ligação covalente de polímeros hidrofílicos na superfície das mesmas, tem demonstrado ser uma estratégia promissora para a obtenção de carreadores furtivos, ou seja, impedem que os carreadores coloidais sejam reconhecidos e capturados por células do sistema fagocitário mononuclear (GREF et al., 1994; GREF et al., 2000; MOSQUEIRA et al., 2001).

Calvo et al. (1997b) desenvolveram nanocápsulas de indometacina com superfície modificada. Nanocápsulas com carga de superfície negativa foram preparadas utilizando a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) como polímero, e as com carga de superfície positiva foram obtidas através do revestimento com quitosana e poli-L-lisina. Estudos *in vivo* realizados na córnea de coelhos demonstraram que as nanocápsulas revestidas com polímeros catiônicos, aumentaram significativamente a quantidade de indometacina na córnea e no humor aquoso, comparados a um colírio comercial. Entretanto, a capacidade em melhorar a penetração da indometacina na córnea foi substancialmente diferente entre as formulações desenvolvidas. O revestimento de quitosana proporcionou uma penetração duas vezes maior, enquanto o revestimento com poli-L-lisina foi ineficaz no aumento da biodisponibilidade ocular da indometacina quando comparadas às nanopartículas não revestidas. Diante disso, foi concluído que o fator responsável pelo aumento na penetração através da mucosa ocular não seria a carga de superfície, mas sim a natureza específica da quitosana que propicia mucoadesão ao epitélio córneo.

Polímeros sintéticos, tais como o poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), poli(ácido-lático-co-ácidoglicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), polietilenoglicol (PEG), têm sido extensivamente estudados e utilizados, tanto para a formação de cápsulas ou esferas, quanto para o revestimento da partícula. Os polímeros sintéticos possuem como vantagem a elevada pureza, não necessitando passos adicionais de purificação, menor risco de toxicidade e maior reprodutibilidade quando comparados aos polímeros naturais (REIS et al., 2006). Entre eles, os polímeros do grupo dos poliésteres são de grande interesse devido à compatibilidade e à biodegradabilidade em metabólitos não tóxicos.

2.2.2.1 Sistemas nanoestruturados associados a antimicrobianos

Aplicações da nanotecnologia para melhorar a eficácia dos antimicrobianos têm sido relatadas em vários estudos. Buscando melhorar as propriedades dos fármacos, alguns trabalhos descrevem a associação de antifúngicos em nanopartículas poliméricas. Espuelas et al. (1997), associaram anfotericina B à nanoesferas de PCL com o intuito de reduzir sua toxicidade. Em 2009, Amaral et al. encapsularam o mesmo fármaco utilizando PLGA, observando uma redução na frequência de aplicação, isenção da toxicidade renal e hepática em comparação a sua forma livre.

Lboutounne et al. (2002) obtiveram nanocápsulas de clorexidina utilizando a PCL como polímero, demonstrando uma ação antimicrobiana superior em comparação a solução do mesmo fármaco. A suspensão de nanocápsulas propiciou, uma liberação sustentada do fármaco por 8 horas. Quando a rifampicina, isoniazida e pirazinamida foram associadas à nanocápsulas de PLGA apresentaram eficácia superior no tratamento de tuberculose em cobaias, quando comparadas ao tratamento convencional (PANDEY et al., 2003).

Nanopartículas de PLGA, Eudragit® RS100 e RL100 contendo ciprofloxacina, apresentaram atividade bactericida, quando testadas frente a *Pseudomonas aeruginosas* e *Staphylococcus aureus*, independente do polímero e das proporções empregadas. Segundo Dillen et al. (2006) a incorporação de ciprofloxacina nas nanopartículas não acarretou perda da atividade antimicrobiana quando comparada à solução do fármaco.

Uma provável explicação para as nanopartículas apresentarem uma melhor eficiência antimicrobiana que a solução de fármaco livre é devido ao tamanho reduzido das partículas, pois elas podem acumular-se na superfície da parede celular e se internalizar com maior facilidade em comparação com partículas de tamanhos maiores (PATEL et al., 2010).

2.3 Polímeros Biodegradáveis

Os materiais poliméricos, pela sua variedade, versatilidade e propriedades, são a classe de materiais mais investigada no processo de micro e nanoencapsulação. O estudo das propriedades físicas, químicas e biológicas dos polímeros antes do processo é de suma importância, já que as propriedades do polímero e do fármaco encapsulado influenciam diretamente na seleção do processo de microencapsulação (JAIN et al, 1998).

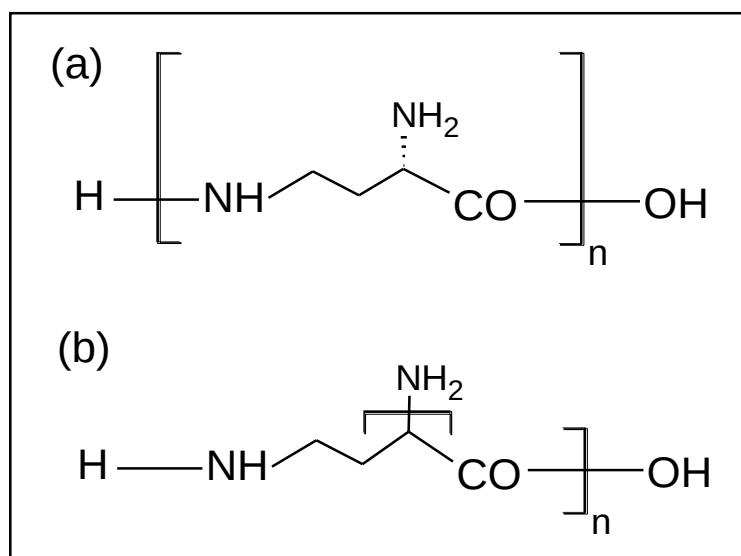
Muitos polímeros biodegradáveis, que podem ser de origem natural, sintética ou semissintética são descritos para serem utilizados, contudo poucos são biocompatíveis, ou seja, a relação entre o polímero e o organismo produz efeitos indesejáveis (JAIN et al, 1998). Polímeros biodegradáveis são aqueles que sofrem degradação química *in vivo*, por hidrólise ou ação enzimática, originando produtos não tóxicos e biocompatíveis capazes de ser metabolizados e excretados pelas vias fisiológicas normais (SALTZMAN, 2011).

As propriedades de superfície tais como a homogeneidade, a hidrofília e a energia de superfície determinam a biocompatibilidade com tecidos, e influenciam nas propriedades físicas tais como a durabilidade, a permeabilidade e a degradabilidade. As propriedades gerais que influenciam diretamente no mecanismo de liberação do fármaco, incluem a massa molecular, a adesividade, a solubilidade baseada nos mecanismos de liberação (difusão ou dissolução) e o sítio de ação (PILLAI; PANCHAGNULA, 2001).

2.3.1 ϵ -poli-L-lisina (ϵ -PLL)

A ϵ -poli-L-lisina (ϵ -PLL) é um homopolímero catiônico de ocorrência natural, formado por 25 a 35 resíduos do aminoácido L-lisina. A polimerização ocorre entre os grupos ϵ -amino e α -carboxila da amina, formando uma amida (Figura 2) (BO et al., 2014). Comercialmente, pode ser encontrada com diversos pesos moleculares resultantes do número de unidades matriciais utilizadas para sua confecção (ANSON; SAVEANT; SHIGEHARA, 1983).

Figura 2: Estruturas químicas: ϵ -PLL (a) e α -PLL (b)



Foi acidentalmente descoberta como um material extracelular produzido por bactérias filamentosas *Streptomyces albulus* spp. A biossíntese é obtida adicionando cepas de *S. albulus* em um balão sob agitação, com temperatura de 30°C (SHIMA; SAKAI, 1977). Segundo, Nishikawa e Ogawa (2006) a ϵ -PLL pode ser efetivamente isolada como um material extracelular produzido por bactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces*, *Kitasatospora* e *Epichloe* (Tabela 1).

A ϵ -PLL pode ser sintetizada por reação de polimerização utilizando a L-lisina ou seus derivados como precursores. Há duas rotas sintéticas distintas para a obtenção da ϵ -PLL e da α -PLL. Para a obtenção de ϵ -PLL de cadeia linear utiliza-se o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) como um agente de ativação para a policondensação da L-lisina em meio aquoso. Em contraste, α -PLL é obtida utilizando N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) em solvente orgânico (HO et al., 2008).

Ho et al. (2012) desenvolveram métodos alternativos para obtenção de ϵ -PLL com um maior peso molecular e, possivelmente, graus mais elevados de ramificação. Uma das técnicas consiste na polimerização de uma solução de L-lisina pelo aquecimento em micro-ondas.

Tabela 1: Produção de ϵ -PLL por micro-organismos

Micro-organismos	Rendimento de ϵ -PLL
<i>Kitasatospora</i> sp. MY 5-36	34, 11 g.L ⁻¹
<i>Streptomyces diastatochromogenes</i> CGMCC3145	0, 20 g.L ⁻¹
<i>Streptomyces griseofuscus</i>	7, 50 g.L ⁻¹
<i>Streptomyces albulus</i> TUST2	20, 20 g.L ⁻¹
<i>Streptomyces</i> sp. M-Z18	227, 00 g.L ⁻¹
<i>Streptomyces violaceusniger</i>	0, 35 g.L ⁻¹
<i>Streptomyces albulus</i> IFO14147	4, 37 g.L ⁻¹
<i>Streptomyces albulus</i>	-
<i>Streptomyces albulus</i>	0, 50 g.L ⁻¹
<i>Streptomyces mashuensis</i>	-
<i>Streptomyces lydicus</i>	0, 15 g.L ⁻¹
<i>Streptomyces albulus</i>	48, 30 g.L ⁻¹
<i>Streptomyces albulus</i>	4, 00 g.L ⁻¹¹
<i>Streptomyces noursei</i> NRRL 5126	2, 00 g.L ⁻¹
<i>Streptomyces Noursei</i> NRRL 5126	2, 30 g.L ⁻¹

Fonte: adaptado de BANKAR; SINGHAL, 2013.

A estrutura molecular ϵ -PLL foi caracterizada por espectroscopia no infravermelho, espectroscopia de Raman e ressonância magnética nuclear (SHIH; SHEN; VAN, 2006). A ϵ -PLL em solução exibe uma variedade de estruturas secundárias, tais como um espiral aleatório, α -helicoidal e conformação β -laminar (SHIH; SHEN; VAN, 2006). Além disso, as transições entre conformações podem ser facilmente conseguidas adicionando concentrações diferentes de sal ou álcool, alterando o pH ou a temperatura (BANKAR; SINGHAL, 2013). Em pH ácidos, ϵ -PLL assume uma conformação eletrostaticamente expandida devido à repulsão dos

grupos α - amino protonados, enquanto que em um pH básico a conformação muda para conformações semelhantes a β -laminar. As moléculas de ϵ -PLL são catiônicas devido aos seus grupos amino carregados positivamente em água (SHIMA et al., 1984).

A ϵ -PLL tem sido aplicada para a conservação de alimentos por se tratar de um polímero solúvel em água, biodegradável, não tóxico, com alta estabilidade térmica e uma ampla atividade antimicrobiana. Sua utilização nas indústrias alimentícias foi aprovada pelas agências dos Estados Unidos, Japão e Coreia (SHIH; SHEN; VAN, 2006; BO et al., 2014). Sua aplicação tem sido estudada também nas áreas de medicamentos, pesticidas e design de material eletrônico. Na área médica apresenta aplicações devido as suas capacidades únicas, como remover seletivamente endotoxinas, reduzindo a toxicidade celular, melhorar a adesão das células, inibindo a atividade da lipase pancreática e a produção da toxina bacteriana bucal (BO et al., 2014).

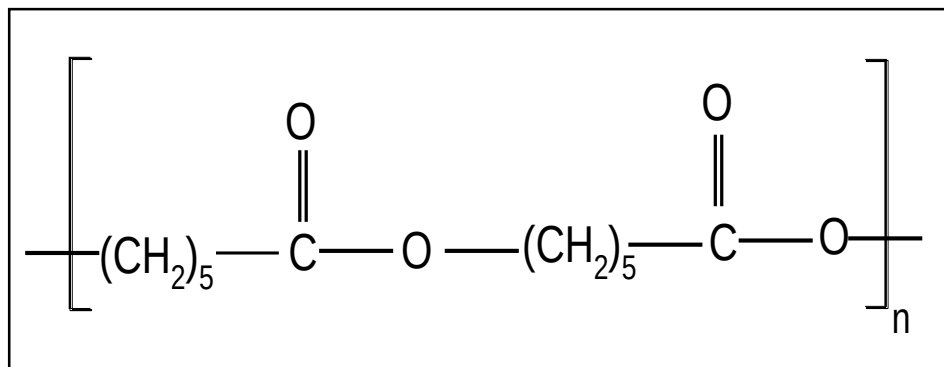
Segundo Zhou e QI (2011) a atividade antimicrobiana de nanotubos de carbono foi aumentada quando foram inseridas partículas de ϵ -PLL. O novo nanocompósito mostrou maior atividade antimicrobiana quando comparado aos nanotubos de carbono sem o polímero. Essa melhora ocorre devido a penetração da ϵ -PLL na dupla camada lipídica das superfícies de bactérias ou fungos. A aplicabilidade de eletrodos recobertos por filmes de ϵ -PLL tem sido investigada como modelo de polieletrólitos eletricamente carregados capazes de modificar a superfície de diversos materiais eletródicos, e como potencialidade para a determinação de compostos farmacêuticos importantes (PEREIRA, et al., 2004).

2.3.2 Poli (ϵ -caprolactona) (PCL)

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL), é um poliéster alifático, de cadeia linear, semicristalino, com grau de cristalinidade de 50%, de caráter hidrofóbico, sendo sintetizada por meio de polimerização por abertura do anel ϵ -prolactona, para obtenção da unidade repetitiva (Figura 3). Possui boas propriedades mecânicas, sendo biocompatível, biodegradável e apresenta facilidade em formar blendas com outros polímeros. Apesar das suas propriedades promissoras, possui uma baixa temperatura de fusão ($T_f = 60^\circ\text{C}$), o que pode gerar problemas durante o processamento. Contudo, devido à sua baixa temperatura de transição vítrea

($T_g = -60\text{ }^{\circ}\text{C}$) e habilidade para aumentar a mobilidade molecular, a PCL tem sido usada como plastificante polimérico (AMASS; AMASS; TIGUE, 1998; SINHA et al., 2004; ROA et al., 2010).

Figura 3: Estrutura química da PCL



A PCL tem sido estudada como polímero para liberação controlada de fármacos e aplicações em várias formulações por ser biocompatível e biodegradável. A sua versatilidade é devido ao fato de que permite a modificação às suas propriedades mecânicas, físicas, químicas e também a sua compatibilidade com polímeros naturais como amido, hidroxiapatita, quitosana e polímeros sintéticos (DASH; KONKIMALLA, 2012). A hidrofobicidade e a cristalinidade da PCL são as causas para a sua biodegradação mais lenta, devido a duas fases distintas, tais como a clivagem hidrolítica não-enzimática de grupos ésteres, e segundo, quando o polímero é mais cristalino e de baixo peso molecular sofre degradação intracelular como evidenciado pela observação dos fragmentos de PCL em macrófagos (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

2.4 Óleos essenciais como fase oleosa em sistemas particulados

A escolha adequada do óleo é fundamental para a formulação de micro ou nanocápsulas, pois quanto maior a afinidade do óleo com o fármaco, maior o percentual de encapsulamento e menor a instabilidade dos sistemas. A quantidade de óleo utilizado no preparo das micro ou nanocápsulas poliméricas pode influenciar em parâmetros como: tamanho de partícula, polidispersão, viscosidade e estabilidade da

formulação. Dessa maneira, o óleo deve ser compatível com o fármaco e não deve interagir com o polímero (SCHAFFAZICK et al., 2003a).

Entre os óleos utilizados, os triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico são os mais empregados, devido a sua biocompatibilidade e solubilidade de grande escala de fármacos. Outros óleos como o de girassol, argan, soja, ácido oleico e oleato de etila são boas alternativas de uso, embora não muito frequentemente utilizados (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Outros estudos vêm sendo realizados com o uso do óleo de oliva, semente de uva, rosa mosqueta e mais recentemente o óleo de coco (SANTOS et al., 2014).

Nesse contexto, os óleos essenciais vêm ganhando importância como matéria prima alternativa no desenvolvimento de sistemas micro ou nanoencapsulados e alguns estudos relatam sua utilização. Óleos essenciais são líquidos oleosos aromáticos e voláteis extraídos de plantas ou especiarias, sendo fontes ricas de compostos biologicamente ativos, tais como os terpenoides e ácidos fenólicos, apresentando propriedades importantes como atividades antioxidante, antimicrobiana e antifúngica (SACCHETTI et al., 2005; HOSSEINI et al., 2013).

Flores et al. (2011) avaliou a atividade antifúngica de nanocápsulas e nanoemulsões contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) frente a *Candida albicans*. Os resultados demonstram que a suspensão de nanocápsulas apresentou melhor atividade antimicrobiana que as nanoemulsões, isso se deve à presença do polímero ao redor do óleo volátil, tornando-o disponível por um período de tempo maior, mantendo assim o efeito inibitório.

2.4.1 Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae)

O gênero *Melaleuca* pertence à família Myrtaceae, que inclui aproximadamente 100 espécies nativas da Austrália e Ilhas do Oceano Índico. O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel é obtido a partir da hidrodestilação das folhas da planta nativa australiana, popularmente conhecida como árvore do chá (*tea tree*), podendo ser extraído ainda dos ramos e caule da árvore (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

Embora existam outras espécies de *Melaleuca*, a nomenclatura *tea tree oil* (TTO) corresponde, exclusivamente, à espécie *M. alternifolia*, e é reconhecido e adotado oficialmente pelo *Australian Therapeutic Goods Administration* (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Dentre as espécies dessa árvore, a *M. alternifolia* é a que

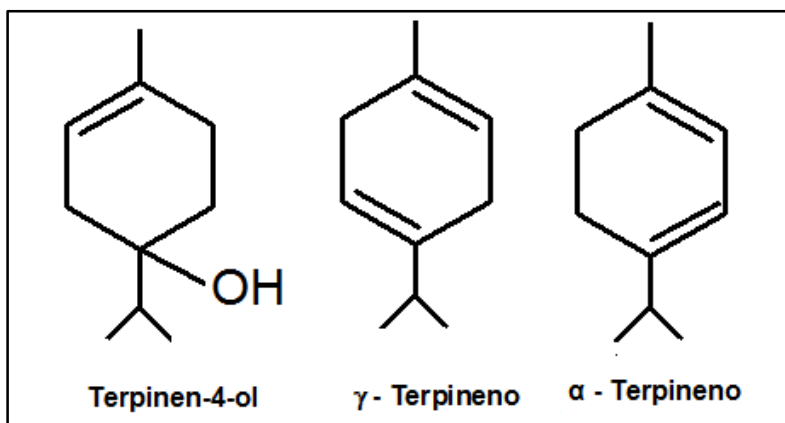
possui em sua composição menor quantidade de componentes com potencial alergênico como o 1,8-cineol e o limoneno (KNIGHT e HAUSEN, 1994).

No Brasil, a produção ainda é inexpressiva obrigando as indústrias de cosméticos e casas de produtos naturais a adquirirem o produto mediante importação. A baixa produção brasileira está relacionada a vários fatores como a ausência de informações técnicas relacionadas à produção de mudas da espécie (CASTRO et al., 2005).

Seu uso tópico é difundido na Austrália em função das suas propriedades medicinais. Há relatos da utilização desse óleo essencial pelos australianos durante a Segunda Guerra Mundial (HARKENTHAL et al., 1999). Até o ano de 1940 era utilizado para o tratamento de doenças nos pés e na assepsia de feridas (HALCÓN; MILKUS, 2004; CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Devido à vasta gama de constituintes, com diferenças sutis em relação ao seu mecanismo de ação, é difícil o desenvolvimento de resistência microbiana em relação ao óleo essencial. Para tanto, seria necessário o desenvolvimento de numerosas mutações simultâneas para transpor as diferentes ações (HAMMER; CARSON; RILEY, 2008).

Os componentes que fazem parte do padrão internacional foram escolhidos devido à sua composição química e a sua atividade biológica (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Os seus principais constituintes é o terpinen-4-ol, seguido do γ -terpineno e α -terpineno (Figura 4), aos quais se atribui o amplo espectro de atividade antisséptica (CARSON; HAMMER; RILEY, 1995; HAMMER; CARSON; RILEY, 2003; OLIVA et al., 2003), antibacteriana (COX et al., 2000), anti-inflamatória (HART et al., 2000) e antiviral (CARSON et al., 2008).

Figura 4: Estrutura química dos principais componentes do óleo essencial de *M. alternifolia*



O óleo essencial de *M. alternifolia* é composto por monoterpenos, sesquiterpenos e seus álcoois correspondentes. A composição do óleo é regulada pelo padrão internacional (ISO 4730), qual se refere às máximas e mínimas concentrações de cada um dos 14 componentes majoritários como mostra a Tabela 2.

Tabela 2: Composição do óleo essencial de *M. alternifolia* Cheel

COMPONENTES	COMPOSIÇÃO (%)	
	ISO 4730	Composição típica
Terpinen-4-ol	≥ 30	40, 1
γ-terpineno	10 – 28	23, 0
α-terpineno	5 – 13	10, 4
1,8-cineol	≤ 15	5, 1
Terpinoleno	1, 5 – 5	3, 1
p-cimeno	0,5 – 12	2, 9
α-pineno	1 – 6	2, 6
α-terpineol	1,5 – 8	2, 4
Aromadendreno	Traços	1, 5
δ-cadineno	Traços	1, 3
Limoneno	0, 5 – 4	1, 0
Sabianeno	Traços	0, 2
Globulol	Traços	0, 2
Viridiflorol	Traços	0, 1

Fonte: adaptado de CARSON; HAMMER; RILEY, 2006.

O terpinen-4-ol está presente em 30 - 40% da composição (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006), sendo o componente que detêm a principal atividade antimicrobiana, pois induz perda da membrana, interferindo na integridade e fisiologia bacteriana. O 1,8-cineol pode aumentar a permeabilidade da membrana facilitando a entrada de outros agentes antimicrobianos e por isso alguns autores o consideram como detentor de efeito antimicrobiano marginal (CARSON; MEE; RILEY, 2002; GROppo, 2002; HAMMER; CARSON; RILEY, 2003).

O óleo essencial de *M. alternifolia* apresenta atividade frente a inúmeras cepas bacterianas, como *Aeromonas sobria*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*,

Klebsiella pneumoniae, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Sterptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Sreptococcus pneumoniae* (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

O óleo essencial exibe também uma extensa atividade antifúngica frente a cepas de *Aspergillus sp*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Cladosporium spp*, *Criptococcus neoformans*, *Epidermophyton floccosum*, além de leveduras, como *Candida spp*, dermatófitos e outros fungos filamentosos (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Todavia, sua atividade antibacteriana pode ser comprometida pela presença inadequada de tensoativos (solubilização do óleo dentro de micelas, impedindo sua interação com o micro-organismo) e substâncias orgânicas presentes nos meios de cultivo (HAMMER; CARSON; RILEY, 2006).

Hart et al. (2000) demonstraram o potencial de utilização do óleo essencial de *M. alternifolia* no controle tópico de reações inflamatórias. A aplicação do óleo essencial sobre a pele conferiu a penetração dos componentes através da derme vascularizada, permitindo a regulação do processo inflamatório. Cox et al. (2000), realizaram experimentos com o objetivo de analisar o mecanismo de ação do óleo essencial de *M. alternifolia* quando aplicado à *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e a *Candida albicans*. Os pesquisadores relataram que quando expostos as suas respectivas concentrações inibitórias mínimas e concentrações bactericidas/fungicidas mínimas, ocorria inibição da respiração e o aumento da permeabilidade no citoplasma bacteriano e na membrana plasmáticas de leveduras.

Hammer et al. (2003) avaliaram a susceptibilidade *in vitro* do óleo essencial de *M. alternifolia*, em bactérias bucais isoladas, verificando redução de 10^3 UFC.mL⁻¹ após 30 segundos e a ausência de micro-organismos após 5 minutos. Os autores sugeriram que o óleo essencial poderia ser utilizado em produtos de manutenção da saúde bucal devido à atividade sobre diferentes micro-organismos.

Flores et al. (2013) avaliaram a atividade antifúngica de nanocápsulas e nanoemulsões contendo o óleo essencial de *M. alternifolia* frente a *Trichophyton rubrum*. De acordo com os resultados, as suspensões de nanocápsulas foram eficientes na redução do crescimento do fungo, prevenindo a infecção das unhas em um modelo *in vitro* de onicomicose, demonstrando assim o potencial da nanoencapsulação do óleo essencial.

Uma das preocupações quanto a incorporação do óleo essencial de *M. alternifolia* em formulações é devido as suas características lipofílicas, que

dificultam sua miscibilidade em produtos aquosos e dependendo da natureza do veículo empregado, pode ocorrer uma baixa disponibilidade de seus constituintes. Além disso, é adsorvido em materiais plásticos, comprometendo sua estabilidade e eficácia (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar micropartículas de ϵ -PLL e nanocápsulas contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel, revestidas ou não com ϵ -PLL e avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* desses sistemas.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter, por meio de secagem por aspersão (*spray drying*), micropartículas de ϵ -PLL;
- Caracterizar as micropartículas quanto ao potencial zeta e pH;
- Obter suspensões de nanocápsulas de PCL contendo óleo essencial de *M. alternifolia* revestidas ou não com ϵ -PLL;
- Caracterizar as nanocápsulas quanto ao diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta e pH;
- Avaliar a estabilidade físico-química das suspensões de nanocápsulas;
- Caracterizar as micropartículas e as nanocápsulas poliméricas por meio de análises morfológicas e espectroscópicas;
- Caracterizar o óleo essencial de *M. alternifolia* por cromatografia gasosa;
- Desenvolver e validar um método analítico por espectrofotometria de UV-Vis para determinação da eficiência de encapsulação (EE) do óleo essencial de *M. alternifolia*;
- Determinar a eficiência de encapsulação, por meio do método de UV-Vis desenvolvido;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* da ϵ -PLL, do óleo essencial de *M. alternifolia*, das micropartículas de ϵ -PLL e das suspensões de nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

- Balança semi-analítica de prato único (SHIMADZU, modelo UX420H);
- Agitador magnético com aquecimento (SOLAB, modelo SL-91);
- Evaporador rotativo (FISATOM, modelo 801);
- Bomba de vácuo (FISATOM, modelo 830);
- Mini Spray drier (LABMAQ, modelo M0.5);
- Potenciômetro digital de bancada (HANNA INSTRUMENTS, modelo HI 21);
- Espectrômetro de auto-correlação a laser (MALVERN INSTRUMENTS, modelo Zetasizer Nanoseries ZS90);
- Espectrofotômetro de UV-Vis (AGILENT TECHNOLOGIES, modelo Cary Win 50 UV);
- Espectrofotômetro de UV (BYOSYSTEMS, modelo BTS – 330);
- Cromatógrafo Gasoso (PERKIN ELMER, modelo Clarus 580)
- Ultracentrífuga refrigerada (HITACHI, modelo Himac CR21GII);
- Difrátômetro de raios X (RIGAKU, modelo Ultima IV);
- Espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21);
- Estufa microbiológica (QUIMIS, modelo Q316M4);
- Metalizador (QUORUM TECHNOLOGIES, modelo SC7620 Mini Sputter Coater);
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater);
- Microscópio eletrônico de varredura (SHIMADZU, modelo SSX-550);
- Microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo (TESCAN, modelo Mira3).

4.2 Reagentes e solventes

- Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) ($\overline{M}_w$ 10 kDa, SIGMA-ALDRICH);
- ϵ -Poli-L-lisina (ϵ -PLL) (SIGMA CHEMICAL);
- Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel (BRASNATUS PRODUTOS NATURAIS);
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico /caprílico (FOCUS QUÍMICA);
- Monooleato de sorbitano (Span 80[®], OXITENO);

- Polissorbato 80 (Tween 80[®], NUCLEAR);
- Acetona P.A (VETEC QUÍMICA FINA);
- Etanol P.A (VETEC QUÍMICA FINA);
- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) (SIGMA ALDRICH);
- Padrão de terpinen-4-ol (SIGMA ALDRICH);
- Cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio P.A (TTC) (VETEC QUÍMICA FINA);
- Caldo B.H.I (OXOID Ltda.);
- Cloreto de sódio 0.9% (ISOFRAMA);
- Ágar Mueller Hinton (MERCK);
- Água Purificada Milli-Q (MILLIPORE).

4.3 Materiais

- Membranas de ultrafiltração Amicon[®] Ultra-0,5 (MILLIPORE);
- Membrana de celulose regenerada de 0,22 μm (KASVI);
- Microplacas de cultura celular 96 poços (SPL LIFE SCIENCES).

4.4 Micro-organismos

Os ensaios microbiológicos foram conduzidos utilizando cepas obtidas do *American Type Culture Collection* (ATCC): *Escherichia coli* ATCC 0022, *Staphylococcus aureus* ATCC 0023, *Streptococcus pyogenes* ATCC 0015 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 0016, *Candida albicans* ATCC 0033.

4.5 Procedimentos experimentais

4.5.1 Obtenção de micropartículas de ϵ -PLL

Para a preparação das micropartículas de ϵ -PLL, pelo método de *spray drying*, o método foi otimizado quanto a: temperatura de secagem, velocidade de atomização e o fluxo de ar na formação do *spray*. Após a definição dos melhores parâmetros, as micropartículas foram obtidas utilizando uma solução aquosa de ϵ -PLL com concentração 10 mg.mL⁻¹. A solução foi atomizada em um mini Spray-dryer MSD 0.5 (Labmaq), nas seguintes condições operacionais: fluxo de alimentação 0,15 mL.min⁻¹, fluxo de ar 35 L.min⁻¹, pressão de ar comprimido de 4 bar, temperatura

de entrada do ar de secagem de $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e temperatura de saída do ar de secagem de $90\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5.2 Rendimento das micropartículas

O rendimento foi calculado em percentagem pela razão entre a massa obtida após a preparação das micropartículas, pela massa de ϵ -PLL adicionada, conforme a apresentado na Equação 1.

$$R = \frac{\text{massa micropartículas}}{\text{massa de } \epsilon\text{-PLL na solução}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

4.5.3 Caracterização físico-química das micropartículas de ϵ -PLL

4.5.3.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro digital (Hanna Instruments) previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente em solução de micropartículas com concentração de 2 mg.mL^{-1} .

4.5.3.2 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta foi determinado pela técnica de mobilidade no Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments). Foi preparada uma solução de micropartículas (1:500 v/v) em água Mili-Q e acondicionadas em uma célula eletroforética a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras foram analisadas em triplicatas e os resultados expressos como média do potencial zeta e desvio padrão.

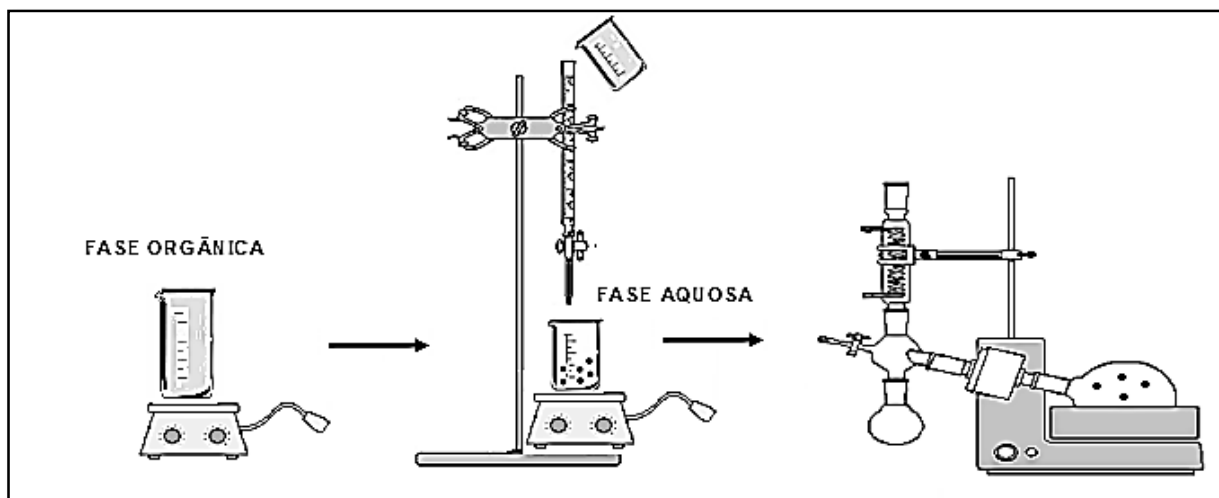
4.5.4 Obtenção das suspensões de nanocápsulas poliméricas

Foram preparadas duas formulações de suspensão de nanocápsulas: a primeira contendo PCL como parede polimérica e a segunda suspensão, foi obtida revestindo a parede polimérica das suspensões de nanocápsulas de PCL com o polímero ϵ -PLL.

As suspensões de nanocápsulas obtidas a partir do polímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL), contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel

foram preparadas pelo procedimento de deposição interfacial do polímero pré-formado (Figura 5) desenvolvido por Fessi et al. (1989). O polímero foi solvatado em acetona em presença de Span 80® e óleo essencial de *M. alternifolia*, constituindo assim a fase orgânica. Em seguida, a fase orgânica foi gotejada utilizando uma bureta (1cm de diâmetro interno), na fase aquosa contendo Tween 80®, previamente preparada e mantida sob agitação magnética e temperatura controlada de 40 °C, com uma taxa de gotejamento de 1 mL.min⁻¹. A agitação magnética foi mantida por mais 10 minutos após o término do gotejamento. Posteriormente, o excesso de solvente da suspensão obtida foi evaporado à pressão reduzida em rotaevaporador (Fisatom), a uma temperatura de 40 °C, até volume final de 10 mL para ajustar a concentração do óleo essencial de *M. alternifolia* em 50 mg.mL⁻¹. Foram preparadas nanocápsulas controle utilizando triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico como fase oleosa na mesma concentração do óleo essencial de *M. alternifolia*.

Figura 5: Método de preparo das suspensões de nanocápsulas poliméricas



As suspensões foram armazenadas em frascos de vidro âmbar. O revestimento catiônico se deu por meio de agitação magnética de uma solução de ϵ -PLL com a suspensão de nanocápsula previamente obtida, por 30 minutos.

Um estudo foi realizado para a escolha da concentração adequada de ϵ -PLL a ser utilizada como revestimento. Com base na literatura (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1997) foram selecionadas para os testes as soluções de ϵ -PLL nas concentrações de 1, 2 e 3 mg.mL⁻¹ e tempos de adsorção de 30, 60, 90 e 120 minutos.

A Tabela 3 apresenta a composição das formulações de nanocápsulas preparadas com PCL e com a solução de ϵ -PLL 2 mg.mL⁻¹ para o revestimento catiônico.

Tabela 3: Composição das nanocápsulas poliméricas contendo óleo essencial de *M. alternifolia* revestidas ou não com ϵ -PLL

Componentes	Formulações			
	NC-0	NC-1	NC-2	NC-3
<i>Fase orgânica</i>				
Poli(ϵ -caprolactona)	250 mg	250 mg	250 mg	250 mg
Óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	-	500 mg	500 mg	-
Trig. Ác. Cáprico/caprílico	500 mg	-	-	500 mg
Span 80®	383 mg	383 mg	383 mg	383 mg
Acetona	27 mL	27 mL	27 mL	27 mL
<i>Fase aquosa</i>				
Tween 80®	383 mg	383 mg	383 mg	383 mg
Água Mili-Q	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL
<i>Revestimento catiônico</i>				
Solução de ϵ -PLL 10 mg.mL ⁻¹	-	-	2 mL	2 mL

NC-0 (nanocápsulas controle); NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*); NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M.alternifolia* revestidas com ϵ -PLL); NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL)

4.5.5 Caracterização físico-química das suspensões das nanocápsulas poliméricas

4.5.5.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro digital (Hanna Instruments) previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas suspensões coloidais, após a preparação e depois de 60 dias do preparo.

4.5.5.2 Determinação do diâmetro médio e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico das suspensões de nanocápsulas e o índice de polidispersão (IPD) foram analisados por espalhamento de luz dinâmica utilizando um aparelho Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments). As suspensões foram diluídas (1:500) em água Mili-Q e filtradas em membrana de 0,22 μm . As amostras foram analisadas em triplicatas e os resultados expressos como média do diâmetro hidrodinâmico e desvio padrão. No mesmo equipamento, foi determinado o potencial zeta das suspensões de nanocápsulas, pela técnica de mobilidade. As suspensões foram diluídas (1:500) em água Mili-Q e acondicionadas em uma célula eletroforética a 25 °C. As amostras foram analisadas em triplicatas e os resultados expressos como média do potencial zeta e desvio padrão. Amostras após 60 dias de preparo também foram analisadas.

4.5.6 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação morfológica e de superfície dos polímeros PCL, ϵ -PLL e das micropartículas de ϵ -PLL, foi realizada em microscópio eletrônico de varredura SSX-550 Superscan (Shimadzu Co.). As amostras foram metalizadas com ouro no equipamento IC-50 Ion Coater (Shimadzu Co.). As micrografias foram obtidas após a visualização das amostras, empregando voltagens de aceleração de 10 ou 15 kV. O registro das imagens ocorreu por meio da utilização do *software* específico.

4.5.7 Análise por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FEG)

A avaliação morfológica e de superfície das nanocápsulas poliméricas foi realizada em microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo MYRA3,

(Tescan). As amostras foram metalizadas com ouro no equipamento SC7620 Mini Sputter Coater. Foi adicionado 10 uL das suspensões no suporte de amostra e secas à 40 °C por 24 horas. As micrografias foram obtidas após a visualização das amostras, empregando voltagens de aceleração de 10 ou 15 kV. O registro das imagens ocorreu por meio da utilização do *software* específico.

4.5.8 Análise por difração de raios X

Os polímeros de partida, as micropartículas e as nanocápsulas poliméricas, foram examinados em difratômetro de raios X Ultima IV (Rigaku), scan de 2° min⁻¹ e 2 θ de 3° a 80°, radiação K α de cobre (λ = 1.5418 Å), corrente de 30 mA e voltagem 40 kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade. As suspensões foram depositadas em um suporte de vidro e secas em estufa à 40 °C até a formação de um filme para a análise.

4.5.9 Avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

Os polímeros de partida, as micropartículas e as nanocápsulas poliméricas foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, em pastilha com KBr, empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2% m/m), no equipamento IR Prestige-21 (Shimadzu), 64 scans.min⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹.

4.5.10 Identificação e quantificação do terpinen-4-ol no óleo essencial de *M. alternifolia* por cromatografia gasosa

A análise quantitativa foi conduzida utilizando cromatógrafo gasoso Clarus 580GC (Perkin Elmer) equipado com detector por ionização de chamas (FID), nas condições operacionais: coluna capilar DB5 (30 m x 0,25 mm); temperatura do injetor de 200 °C; temperatura de detector FID de 200 °C; programação da coluna com temperatura inicial de 50 °C (3 min), até 160 °C com velocidade de 3 °C min⁻¹; gás carreador nitrogênio (2,0 mL.min⁻¹). O óleo essencial de *M. alternifolia* e o terpinen-4-ol foram diluídos em clorofórmio (0,5%) e injetado 1 µL. A quantificação do terpinen-4-ol foi obtida por meio de normalização de áreas (%).

4.5.11 Determinação do comprimento de onda (λ) de máxima absorção do óleo essencial de *M. alternifolia*

Uma solução etanólica do óleo essencial de *M. alternifolia* (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi preparada e realizado uma varredura em um espectrofotômetro Cary Win 50 UV (Agilent) num intervalo de leitura de 200 a 800 nm, para determinar o comprimento de onda de máxima absorção.

4.5.12 Validação do método analítico para a quantificação do óleo essencial de *M. alternifolia* presente nas suspensões de nanocápsulas

O desenvolvimento do método analítico por espectrofotometria de UV-Vis foi realizado com o objetivo de padronizar um método de quantificação do óleo essencial de *M. alternifolia* nas suspensões de nanocápsulas. O método foi validado estudando as seguintes figuras de mérito: especificidade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e precisão, segundo as normas da *International Conference on Harmonization* (ICH) (2005) e da resolução R.E 899, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2003).

A especificidade foi avaliada por comparação dos espectros representativos da nanocápsula NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*) e da nanocápsula NC-0 (nanocápsula controle) para a verificação de interferentes.

A linearidade foi determinada com base no cálculo de regressão linear empregando mínimos quadrados, a partir da construção de uma curva analítica (absorbância versus concentração) utilizando-se seis soluções-padrão de óleo essencial de *M. alternifolia* em etanol em quintuplicata (5, 0; 10, 0; 15, 0; 20, 0; 25, 0 e 30, 0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados.

A análise do LD e o LQ foram baseados na curva analítica obtida para a linearidade. Para sua determinação foram utilizados os valores da inclinação da curva (*slope*) e o desvio padrão (DP) do intercepto com eixo y, de acordo com as equações 2 e 3:

$$\text{LD} = \frac{3,3 \times \text{DP}}{S} \quad (\text{Equação 2})$$

S

$$\text{LD} = \frac{10 \times \text{DP}}{S} \quad (\text{Equação 3})$$

S

Onde: DP é o desvio padrão médio do intercepto com o eixo y e S é a inclinação da reta ou *slope*.

A precisão foi comprovada por dois métodos, intra-corrida (repetitividade) e inter-corridas (precisão intermediária). No primeiro, avaliou-se três diferentes níveis de concentração (10, 0; 20, 0 e 30, 0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com 3 leituras individuais de cada concentração no mesmo dia. A precisão intermediária foi observada por meio da análise dos três níveis de concentração em triplicata por três dias diferentes. Os resultados foram expressos como média do desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

4.5.13 Determinação da eficiência de encapsulação do óleo essencial de *M. alternifolia* nas suspensões de nanocápsulas

A quantificação de óleo essencial de *M. alternifolia* encapsulado nas nanocápsulas foi realizada pelo método indireto. As nanocápsulas foram submetidas à ultrafiltração usando um dispositivo de centrifugação (Amicon® 10.000 Mw, Milipore) à 14.000 rpm por 30 minutos. A concentração de óleo essencial não encapsulado ao sistema carreador foi determinada após a análise do ultrafiltrado resultante do processo de ultracentrifugação das formulações, onde uma alíquota foi diluída em etanol (1:1000 v/v). A eficiência de encapsulação (EE%) (n = 6) foi determinada a partir da Equação 4.

$$\text{EE\%} = \frac{\text{M.alternifolia inicial} - \text{M.alternifolia livre}}{\text{M.alternifolia inicial}} \times 100 \text{ (Equação 4)}$$

4.5.14 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. alternifolia*, do terpinen-4-ol, do polímero ϵ -PLL, das micropartículas de ϵ -PLL e das suspensões de nanocápsulas NC-0 (nanocápsulas controle), NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*), NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia* revestidas com ϵ -PLL) e NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL), foi realizada em modelo experimental de microdiluição em caldo conforme

descrito pela NCCLS (2003). Os micro-organismos testados foram: *E. coli*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

4.5.14.1 Padronização das suspensões bacterianas

As suspensões bacterianas foram preparadas adicionando-se algumas colônias do micro-organismo à solução de salina estéril, até atingir turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). Em seguida foi realizada a leitura em um espectrofotômetro BTS-330 (Byosystems) em 590 nm para confirmação da concentração.

4.5.14.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foi avaliada utilizando a técnica de microdiluição em caldo, de acordo com metodologia proposta por NCCLS (2003). As microplacas com 96 poços (SPL Life Sciences) foram preparadas de forma que cada poço tivesse ao final um volume de 100 µL. Os poços das microplacas foram preenchidos com 100 µL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e os agentes antimicrobianos de interesse (óleo essencial de *M. alternifolia*, terpinen-4-ol, solução de ϵ -PLL 2 mg.mL⁻¹, solução de micropartículas de ϵ -PLL 2 mg.mL⁻¹ e as suspensões de nanocápsulas, NC-0 (nanocápsulas controle); NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*); NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia* revestidas com ϵ -PLL) e NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL).

A faixa de concentração para cada agente antimicrobiano está demonstrada na Tabela 4. Adicionalmente, foram distribuídos 10 µL da suspensão de bactérias e levedura em cada poço das microplacas. Foi realizado o controle do meio de cultura e o controle de crescimento bacteriano.

As microplacas foram incubadas em estufa à 37 °C por 24 h. Os testes foram realizados em duplicatas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada visualmente, utilizando-se cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) 3%, do qual 25 µL foram adicionados em cada orifício das microplacas. No decorrer de 30 min os poços em que houve inibição do crescimento bacteriano, permanecem incolores, enquanto os poços nos quais houve crescimento microbiano coram de vermelho (DUARTE et al., 2005).

Tabela 4: Faixa de concentração usada no teste de CIM

Formulações	Faixa de Concentração testada (mg.mL ⁻¹)
Óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	442, 50 – 3, 46
Terpinen-4-ol	467, 00 – 3, 65
Solução de ϵ -PLL 2 mg.mL ⁻¹	10, 00 – 0, 08
Solução de micropartículas de ϵ -PLL 2 mg.mL ⁻¹	16, 97 – 0, 98
NC-0	33, 33 – 0, 35
NC-1	33, 33 - 0, 35
NC-2	34, 67 – 0, 36
NC-3	1, 33 – 0, 01

NC-0 (nanocápsulas controle), NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M.alternifolia*); NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M.alternifolia* revestidas com ϵ -PLL); NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL).

4.5.14.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

As amostras que não apresentaram coloração com o corante TCC, foram semeadas em ágar Mueller Hinton e incubadas a 37 °C durante 24 h. A ausência de crescimento bacteriano indica a concentração bactericida mínima ou concentração fungicida mínima

4.5.15 Análise estatística do estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas

A significância estatística das diferenças de diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão, pH e potencial zeta nas nanocápsulas revestidas ou não com ϵ -PLL durante o armazenamento de 60 dias, foi calculada por análise do teste t de *Student* pareado. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Todos os testes foram realizados usando o programa GraphPad Prism versão 5.00 (San Diego, CA).

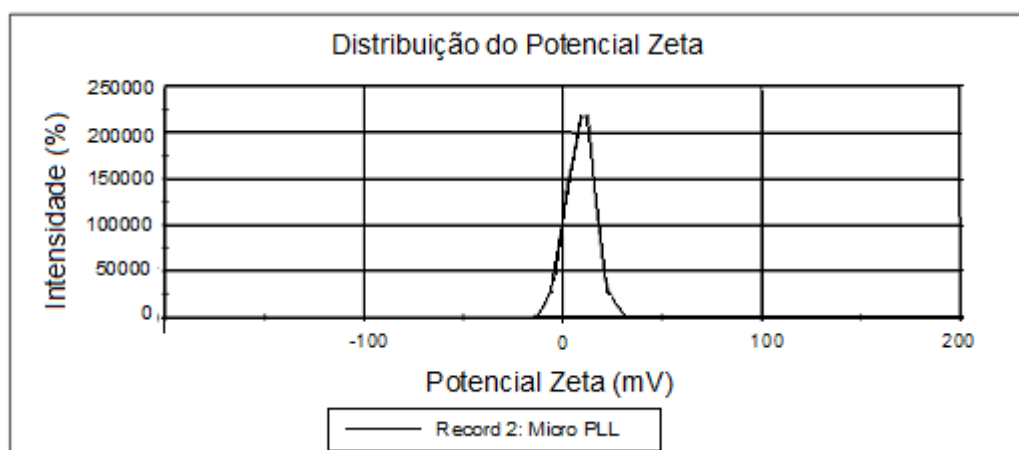
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e caracterização físico-química das micropartículas ϵ -PLL

Por meio da metodologia proposta foi possível obter micropartículas de ϵ -PLL com morfologia esférica. As micropartículas apresentaram-se como um pó fino, higroscópico, de cor branca a levemente amarelada. O rendimento foi calculado com base na Equação 1. O rendimento obtido foi de $42,4 \% \pm 3,9$. O baixo rendimento deve-se ao fato de parte do material particulado ficar aderido nas superfícies do equipamento.

A solução das micropartículas apresentou pH em torno de $5,1 \pm 0,04$ e potencial zeta com valor positivo, $+ 8,2 \pm 0,6$ mV (Figura 7). Esses valores eram esperados, em virtude da presença de grupos aminos protonados.

Figura 6: Potencial Zeta da solução de micropartículas de ϵ -PLL



5.2 Preparação e caracterização das suspensões de nanocápsulas contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel revestidas ou não ϵ -PLL

Para o revestimento das nanocápsulas, foi realizado um estudo preliminar para a escolha da solução de ϵ -PLL e da concentração final nas suspensões de nanocápsulas. A fim de otimizar a adsorção da ϵ -PLL nas nanocápsulas de PCL NC-0 (nanocápsulas controle) e NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*), as suspensões foram incubadas na presença de diferentes quantidades de ϵ -PLL. Foram selecionadas para os testes as soluções de ϵ -PLL nas

concentrações de 1, 2 e 3 mg.mL⁻¹ e tempos de adsorção de 30, 60, 90 e 120 minutos. A eficiência do processo de revestimento foi avaliada medindo o diâmetro médio (DM), o índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (PZ) das nanocápsulas. Os resultados estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5: Características físico-químicas de nanocápsulas revestidas com diferentes concentrações de ϵ -PLL

Solução de ϵ-PLL 1 mg.mL⁻¹			
TEMPO (min)	DM (nm)	IPD	PZ (mV)
30	434, 8	0, 58	+ 10, 70
60	579, 5	1, 00	+ 8, 75
90	532, 1	1, 00	+ 10, 20
120	643, 3	1, 00	+ 7, 96
Solução de ϵ-PLL 2 mg.mL⁻¹			
TEMPO (min)	DM (nm)	IPD	PZ(mV)
30	403, 5	0, 28	+ 8, 06
60	683, 7	0, 79	+ 10, 30
90	792, 8	0, 90	+ 8, 74
120	448, 3	0, 97	+ 10, 80
Solução de ϵ-PLL 3 mg.mL⁻¹			
TEMPO (min)	DM (nm)	IPD	PZ(mV)
30	683, 8	0, 70	+ 11, 10
60	-	-	+ 8, 69
90	779, 0	0, 60	+ 10, 80
120	653, 6	1, 00	+ 8, 92

As nanocápsulas apresentam potencial zeta positivo, característico dos grupos aminos da ϵ -PLL, o que indica que o processo de adsorção é mediado por interação eletrostática, como já proposto por CALVO et al. (1997). A quantidade de ϵ -PLL na solução aquosa exerce influência significativa sobre o diâmetro e a carga de superfície das nanopartículas. No presente trabalho, o revestimento com solução ϵ -PLL 1 e 3 mg.mL⁻¹ gerou nanocápsulas com índice de polidispersão acima do

desejado (0, 5). Observou-se também que a medida que aumenta o tempo de adsorção, o IPD aumenta.

Diante dos resultados obtidos, a solução de ϵ -PLL a 2 mg.mL^{-1} e com tempo de adsorção de 30 minutos, foi escolhida para conduzir os estudos seguintes, pois as nanocápsulas com ela revestida apresentaram um diâmetro médio de 403,5 nm com índice de polidispersão de 0,28 de e potencial zeta + 8,06 mV. Para reduzir o diâmetro médio, foi controlada a velocidade de gotejamento e a velocidade de agitação.

Os sistemas nanoestruturados, NC-0 (nanocápsulas controle) e NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M.alternifolia*) após preparação, apresentaram aspecto macroscópico homogêneo e leitoso, com reflexo azulado (efeito *Tyndall*). O reflexo azulado se deve ao movimento Browniano das partículas, devido ao seu tamanho nanométrico (SCHAFFAZICK et al., 2002).

Os resultados do diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH (Tabela 6) mostram que o método de deposição interfacial de um polímero pré-formado foi eficiente para encapsulação do óleo essencial de *M. alternifolia*, e que as partículas de ϵ -PLL adsorvem na superfície das nanocápsulas de PCL, tornando-as catiônicas.

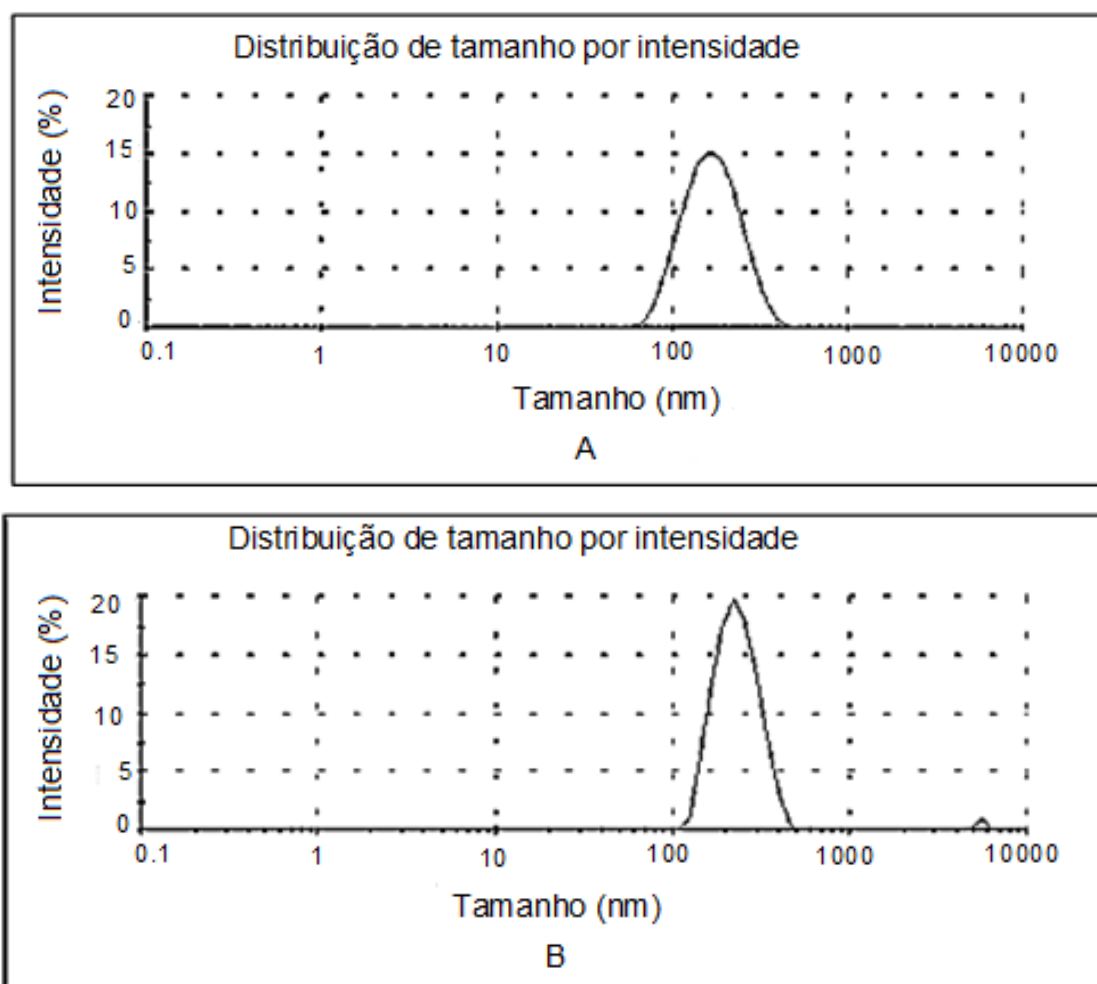
Tabela 6: Características físico-químicas das nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia* revestidas ou não com ϵ -PLL

Nanocápsulas	DM (nm) $\pm$ DP	IPD $\pm$ DP	PZ (mV) $\pm$ DP	pH $\pm$ DP
NC-0	184, 5 $\pm$ 3, 01	0, 18 $\pm$ 0, 04	-40, 3 $\pm$ 1, 01	5, 96 $\pm$ 0, 11
NC-1	166, 9 $\pm$ 2, 22	0, 28 $\pm$ 0, 01	-39, 9 $\pm$ 0, 93	5, 55 $\pm$ 0, 05
NC-2	201, 9 $\pm$ 2, 50	0, 22 $\pm$ 0, 04	+20, 3 $\pm$ 0, 5	5, 00 $\pm$ 0, 04
NC-3	189, 2 $\pm$ 2, 55	0, 18 $\pm$ 0, 05	+15, 2 $\pm$ 0, 5	5, 09 $\pm$ 0, 03

NC-0 (nanocápsulas controle); NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M.alternifolia*); NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M.alternifolia* revestidas com ϵ -PLL); NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL).

Todas as suspensões apresentaram partículas com diâmetro nanométrico (Figura 7) adequado e compatível com sistemas preparados pelo método proposto. Os valores de índice de polidispersão (IPD) podem variar entre 0 e 1, sendo que, valores próximos a 0 indicam homogeneidade da dispersão e valores maiores ou próximos a 0,5 indicam uma alta heterogeneidade nos diâmetros das partículas (AVADI et al, 2010). Todas as suspensões apresentaram homogeneidade, sendo consideradas monodispersas.

Figura 7: Diâmetro médio de partícula para as suspensões NC-1 (A) e NC-2 (B)



Os resultados de potencial zeta para as NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*) e NC-0 (nanocápsulas controle), foram -39,9 mV e -40,3 mV, respectivamente. Esses valores são decorrentes da presença de grupamentos carboxílicos nas extremidades da cadeia polimérica da PCL (KIM, 2012). Como descrito na literatura, nanocápsulas preparadas com PCL apresentam potencial zeta negativo devido ao seu caráter ânionico (CALVO et al., 1997a; SCHAFFAZICK et al., 2003; FLORES et al., 2011). Os valores positivos +20 mV e +15 mV, obtidos para as nanocápsulas NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia* revestidas com ϵ -PLL) e NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL), respectivamente, provam que houve adsorção da ϵ -PLL na superfície das partículas. Esse valor positivo é referente aos grupos aminos ($-\text{NH}_3^+$) da ϵ -PLL (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1997).

O potencial zeta (PZ) é um importante indicador de estabilidade, pois reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante (MOSQUEIRA et al., 2000; SCHAFFAZICK et al., 2003). Em geral, as partículas podem ser consideradas estáveis quando o valor absoluto do potencial zeta (PZ) é próximo de $|30|$ mV, enquanto que potenciais próximos a 0 e 5 mV podem produzir o fenômeno de floculação mais facilmente (NEVES et al, 2013).

Pode-se observar que o núcleo oleoso não interferiu no potencial zeta. Este resultado também foi observado por Mosqueira et al. (2000) quando comparam nanocápsulas de PLA com núcleos oleosos diferentes.

Todas as suspensões apresentaram pH ácidos. As suspensões NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*) e NC-0 (nanocápsulas controle), apresentaram um valor mais alto de pH, $5,55 \pm 0,05$ e $5,96 \pm 0,11$, respectivamente. A presença do polímero PCL contribuiu para a obtenção de suspensões de caráter ácido devido a presença do grupo éster. Enquanto as suspensões NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia* revestidas com ϵ -PLL) e NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL) apresentaram um valor mais baixo pH, $5,00 \pm 0,04$ e $5,09 \pm 0,03$, respectivamente. Essa diminuição nas nanocápsulas revestidas com ϵ -PLL é em virtude da presença de grupos aminos protonados.

5.2.1 Estudo de estabilidade das suspensões de nanocápsulas

A estabilidade físico-química das suspensões de nanocápsulas foi avaliada à temperatura ambiente, com proteção da luz, após 60 dias. As formulações preparadas foram estáveis macroscopicamente. Todas as suspensões tiveram um aumento tanto no diâmetro médio (DM) quanto no índice de polidispersão (IPD). Entretanto, foi observada uma diminuição em relação ao potencial zeta (PZ) como mostrado na Tabela 7.

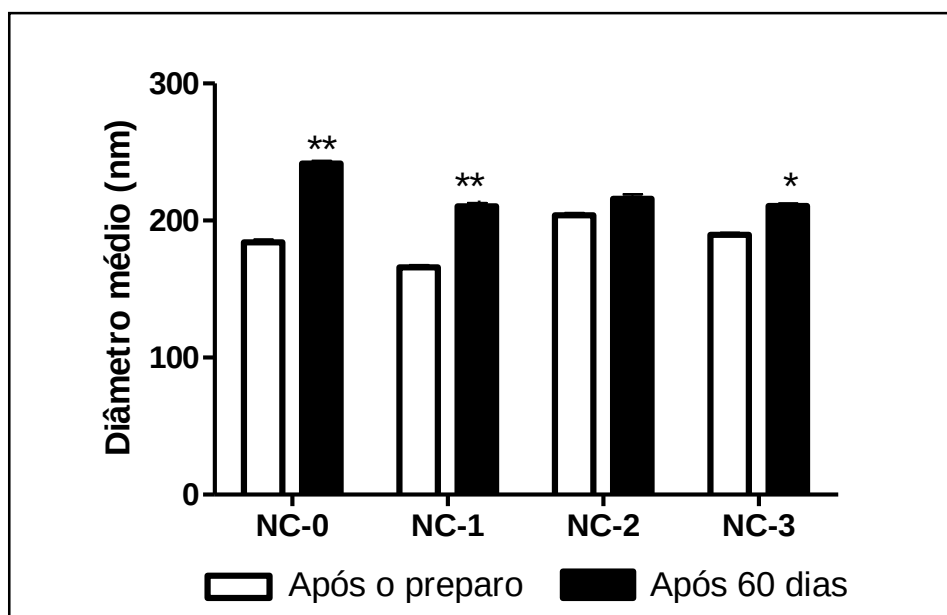
Tabela 7: Características físico-químicas das nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia* revestidas ou não com ϵ -PLL após 60 dias

Nanocápsulas	DM (nm) $\pm$ DP	IPD $\pm$ DP	PZ (mV) $\pm$ DP	pH $\pm$ DP
NC-0	239, 5 $\pm$ 3, 01	0, 188 $\pm$ 0, 01	-36, 4 $\pm$ 2, 45	5, 65 $\pm$ 0, 08
NC-1	210, 0 $\pm$ 4, 03	0, 209 $\pm$ 0, 01	-37, 5 $\pm$ 0, 77	5, 40 $\pm$ 0, 07
NC-2	214, 8 $\pm$ 5, 35	0, 170 $\pm$ 0, 03	+2, 3 $\pm$ 0, 34	3, 29 $\pm$ 0, 05
NC-3	210, 1 $\pm$ 3, 08	0, 160 $\pm$ 0, 15	+2, 5 $\pm$ 0, 43	4, 11 $\pm$ 0, 05

NC-0 (nanocápsulas controle); NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M.alternifolia*); NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M.alternifolia* revestidas com ϵ -PLL); NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL).

Pode-se notar que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no diâmetro médio de partícula para as formulações (Figura 8), NC-0 (nanocápsulas controle), NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*) e NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL).

Figura 8: Diâmetro médio de partícula, após a preparação e após 60 dias para as suspensões de nanocápsulas



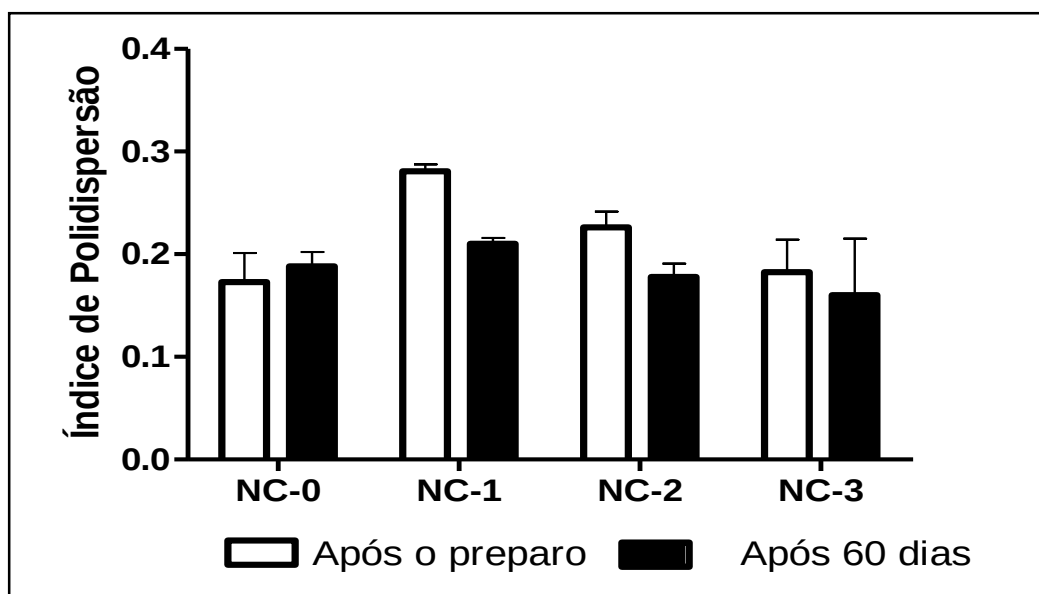
NC-0 (nanocápsulas controle); NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M.alternifolia*); NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M.alternifolia* revestidas com ϵ -PLL); NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Não houve diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) no índice de polidispersão de nenhuma das suspensões de nanocápsulas, mesmo com o aumento do diâmetro de partícula (Figura 9).

Referente aos valores de pH, observou-se um decréscimo em todas as suspensões (Figura 10). As suspensões NC-0 (nanocápsulas controle) e NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*) não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) após o armazenamento. Entretanto, as suspensões NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia* revestidas com ϵ -PLL) e NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL), tiveram uma diminuição significativa ($p < 0,05$). Isso ocorre pelo fato do polímero de ϵ -PLL estar apenas adsorvido por interação eletrostática na superfície das partículas.

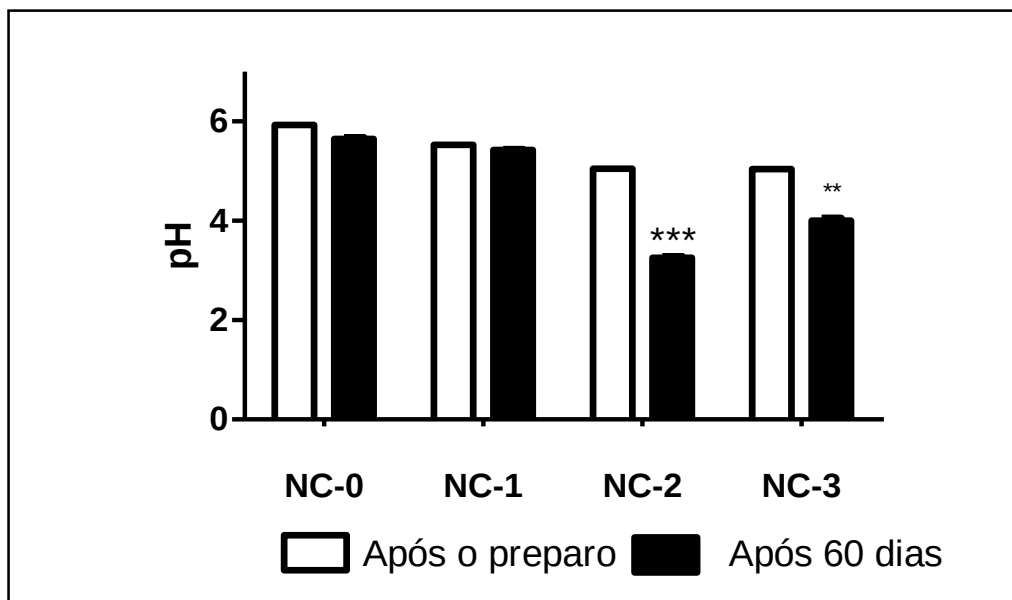
Segundo Schaffazick et al. (2003a) a diminuição dos valores de pH, em um curto período de tempo, pode ser atribuída tanto à ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero, quanto à hidrólise, dependendo da hidrofobicidade do mesmo.

Figura 9: Índice de polidispersão, após a preparação e após 60 dias para as suspensões de nanocápsulas



NC-0 (nanocápsulas controle); NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*); NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia* revestidas com ϵ -PLL); NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL).

Figura 10: Valores de pH, após a preparação e após 60 dias para as suspensões de nanocápsulas

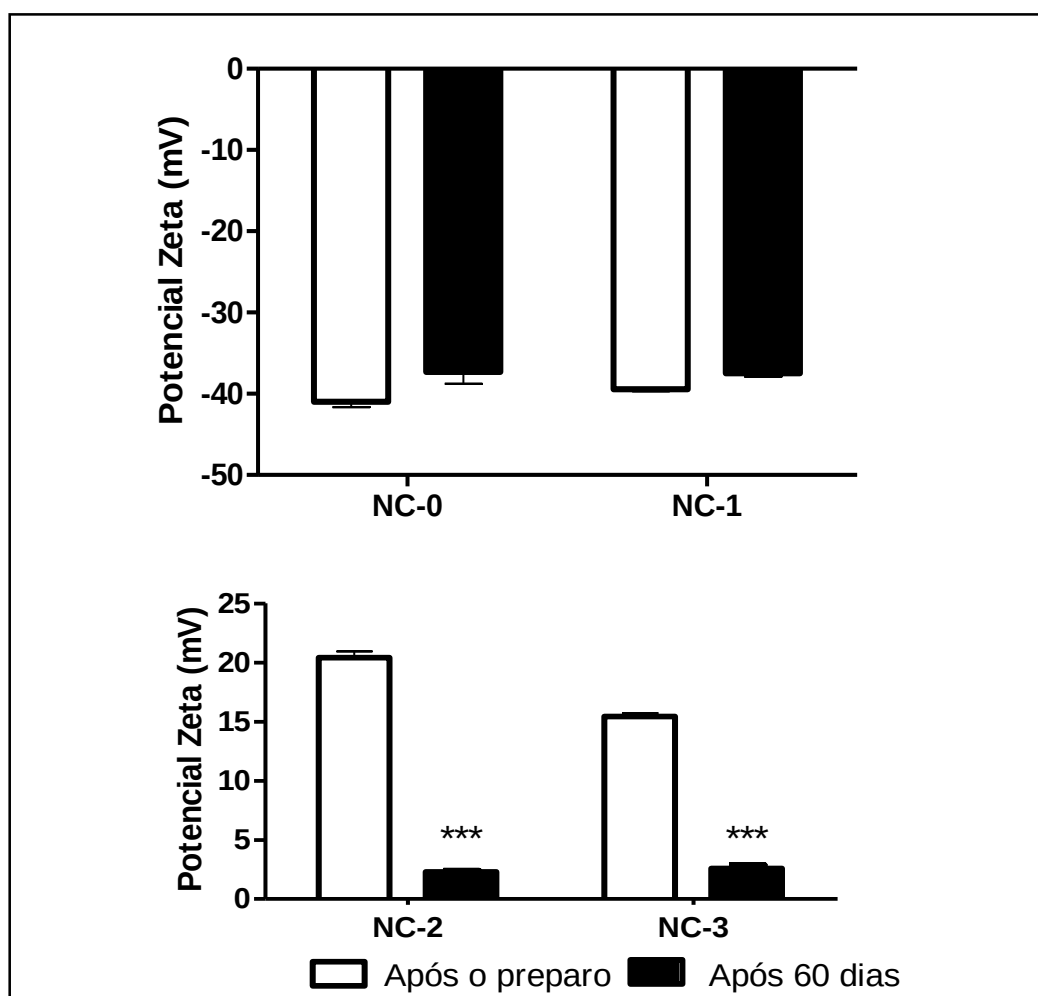


NC-0 (nanocápsulas controle); NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*); NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia* revestidas com ϵ -PLL); NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL) ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Quanto ao potencial zeta (Figura 11), não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) para suspensões NC-0 (nanocápsulas controle) e NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*) após o armazenamento, o que permite prever uma boa estabilidade coloidal, devido a uma alta energia de

limitação entre as partículas (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). As suspensões NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia* revestidas com ϵ -PLL) e NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL), apresentaram diferença estatísticas significativas ($p < 0,05$). Esta diminuição no potencial zeta pode ser atribuído tanto à queda no pH do meio de suspensão, como a degradação do núcleo oleoso, resultando em um aumento da quantidade de gotículas de óleo na suspensão (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1996).

Figura 11: Potencial zeta, após a preparação e após 60 dias para as suspensões de nanocápsulas

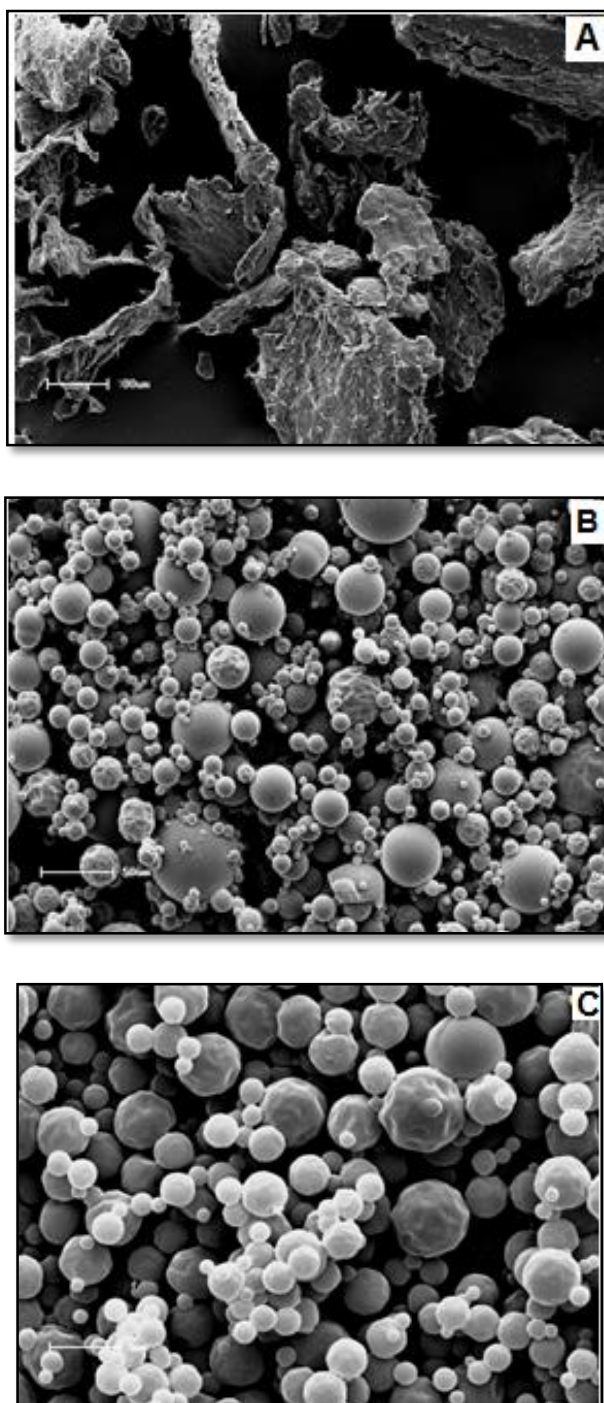


NC-0 (nanocápsulas controle); NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*); NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia* revestidas com ϵ -PLL); NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL); *** $p < 0,001$.

5.3 Análises morfológicas e de superfície

A avaliação morfológica e de superfície obtidas por MEV para os polímeros PCL, ϵ -PLL e as micropartículas de ϵ -PLL estão indicados na Figura 12.

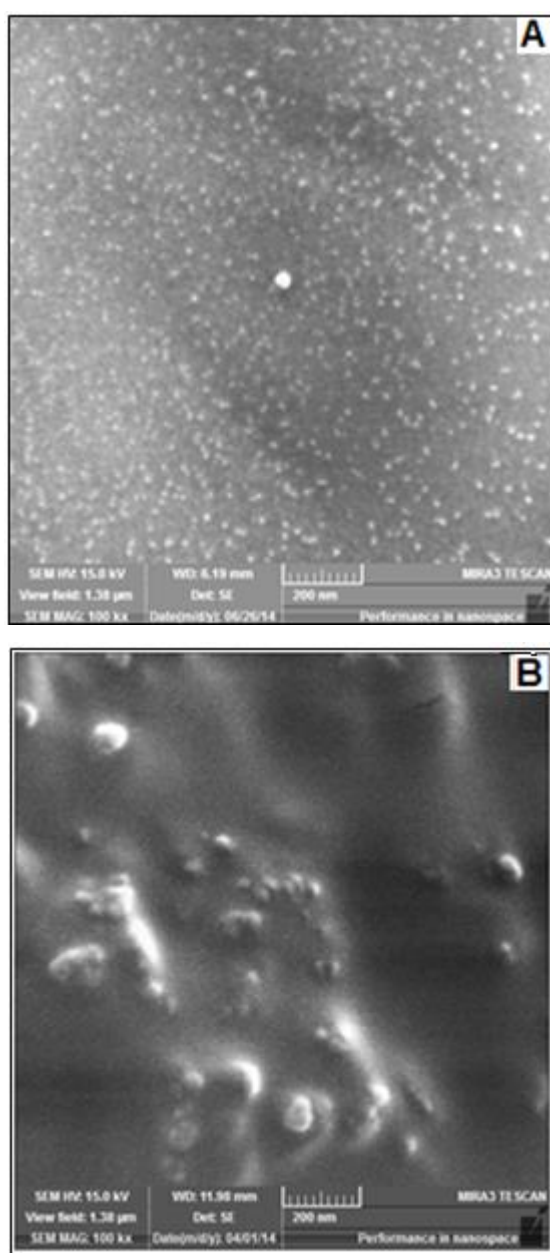
Figura 12: Aspectos morfológicos da PCL (A), da ϵ -PLL (B) e das micropartículas de ϵ -PLL (C)



As fotomicrografias do polímero PCL, demonstram uma superfície levemente irregular, enquanto as da ϵ -PLL e as micropartículas de ϵ -PLL, apresentam formato esférico, com superfície lisa e regular.

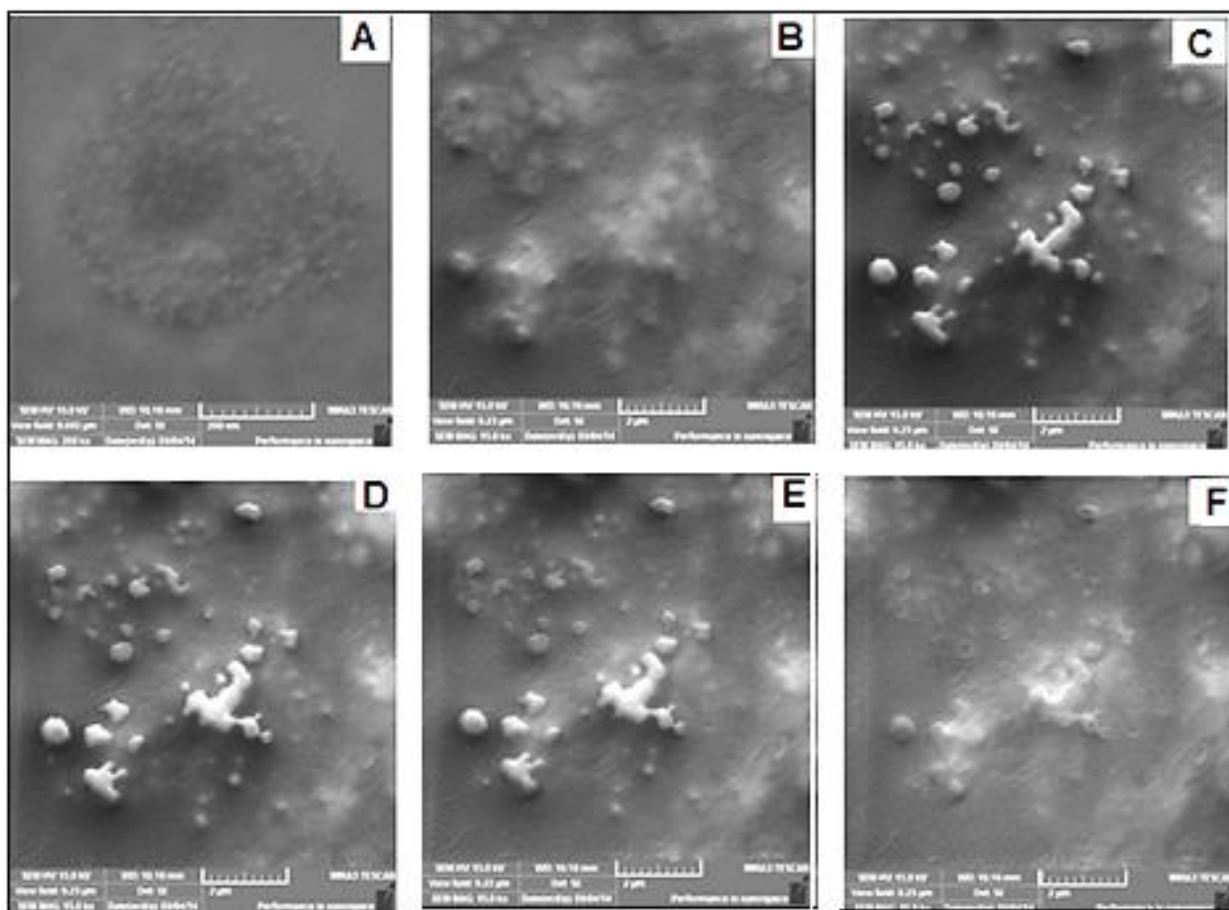
As suspensões de nanocápsulas foram caracterizadas por FEG. A Figura 13 comprova o resultado do diâmetro médio de partícula obtido pela técnica de espalhamento de luz para as suspensões NC-0 (nanocápsulas controle) e NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*).

Figura 13: Aspectos morfológicos das suspensões de nanocápsulas NC-0 (A) e NC-1 (B)



Não foi possível obter as fotomicrografias das nanocápsulas NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia* revestidas com ϵ -PLL) e NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL) por FEG, em decorrência da interação do polímero ϵ -PLL com o feixe de elétrons a medida que as fotomicrografias vão sendo realizadas. A sequência de fotomicrografias (Figura 14) demonstra essa interação e como as nanocápsulas vão sendo modificadas.

Figura 14: Sequência de fotomicrografias (A-F) das interações das nanocápsulas revestidas com ϵ -PLL com feixe de elétrons



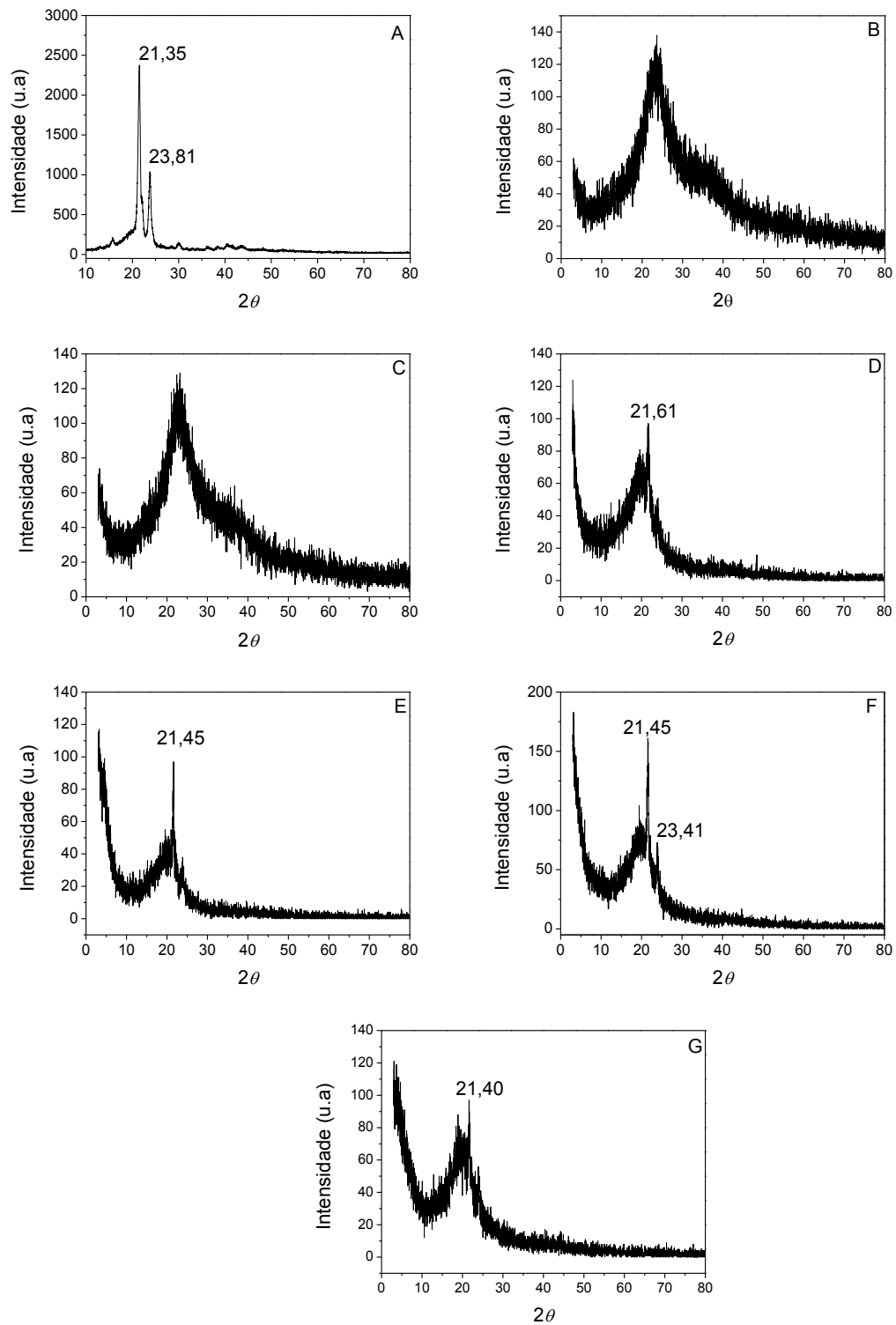
A difração de raios X permite distinguir materiais entre cristalinos e amorfos, sendo que substâncias cristalinas possuem picos bem definidos enquanto os compostos amorfos não apresentam os mesmos planos nítidos característicos dos cristais (DHIRENDRA et al, 2009). Em geral, os sólidos amorfos são mais solúveis do que as formas cristalinas, devido às energias livres envolvidas no processo de dissolução. Sólidos no estado amorfo têm moléculas dispostas aleatoriamente, portanto, pouca energia é necessária para separá-los. Consequentemente, a sua dissolução é mais rápida do que quando na forma cristalina (RIEKES et al., 2011).

A Figura 15 sumariza os resultados obtidos por difração de raios X para a PCL, a ϵ -PLL, para as micropartículas de ϵ -PLL e para as suspensões NC-0 (nanocápsulas controle), NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*), NC-2 (nanocápsulas de óleo de essencial *M. alternifolia* revestidas com ϵ -PLL) e NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL).

A figura de difração de raios X para a PCL (Figura 15-A) exibiu picos cristalinos, em $2\theta = 21, 35$ e $23, 81$ indicando que a PCL possui forma cristalina. As propriedades físicas da PCL variam de acordo com a massa molar e densidade do produto, podendo apresentar característica amorfa ou semicristalina, dependendo da sua estereoquímica, do tratamento térmico recebido e da sua temperatura de transição vítrea, sendo estas características, que determinam também a sua utilização comercial (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

A figura de difração de raios X da ϵ -PLL (Figura 15-B) mostra um padrão muito pequeno de fase microcristalina. Segundo ASANO et al. (2007) a fase microcristalina é em $2\theta = 19^\circ$. Entretanto, para todos os materiais analisados (Figura 15C-15G), os resultados sugerem que o processo de nanoencapsulação promoveu uma diminuição notável dos picos de difração cristalina característicos da PCL levando à amorfização do polímero (ANSARI et al., 2011).

Figura 15: Figuras de difração de raios X da PCL (A), da ϵ -PLL (B), micropartículas de ϵ -PLL (C), NC-0 (D), NC-1 (E), NC-2 (F), NC-3 (G)



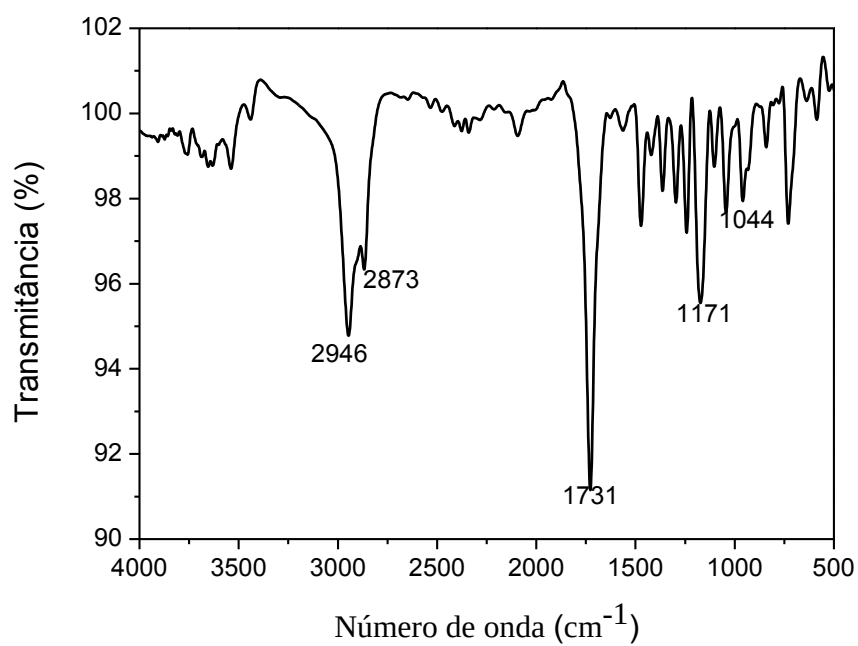
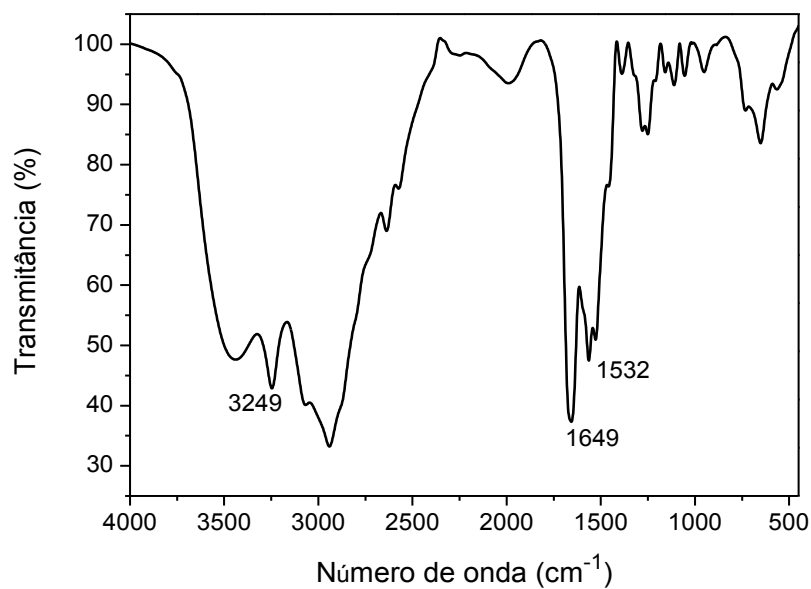
5.4 Avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

Os espectros obtidos por meio de IVTF permitem caracterizar polímeros, fármacos e blends poliméricos, em função da detecção de grupos funcionais, assim como identificar a presença de interações moleculares pela comparação de deslocamentos, variações de intensidade, alargamento ou aparecimento de novas bandas com um espectro característico da amostra (LOPES; FASCIO, 2004). A radiação no infravermelho faz com que átomos de compostos orgânicos vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações covalentes que os ligam. O processo é quantizado, porém o espectro vibracional costuma aparecer como uma série de bandas, porque a cada mudança de nível de energia vibracional corresponde a uma série de mudanças nos níveis de energia rotacional, desta forma, as linhas se sobrepõem dando origem às bandas observadas no espectro (PAVIA et al., 2010).

Os espectros de IVTF dos polímeros PCL, ϵ -PLL e do óleo essencial de *M. alternifolia*, estão mostrados nas Figuras 16, 17 e 18. A PCL (Figura 16) apresentou bandas características do grupamento éster, com uma banda em 1731 cm^{-1} , referente ao estiramento C=O. As bandas observadas em 1044 e 1171 cm^{-1} são referentes ao estiramento da ligação C–O. As vibrações simétricas e assimétricas do grupamento $-\text{CH}_2$, foram observadas em 2946 e 2873 cm^{-1} , respectivamente (PAVIA et al., 2012).

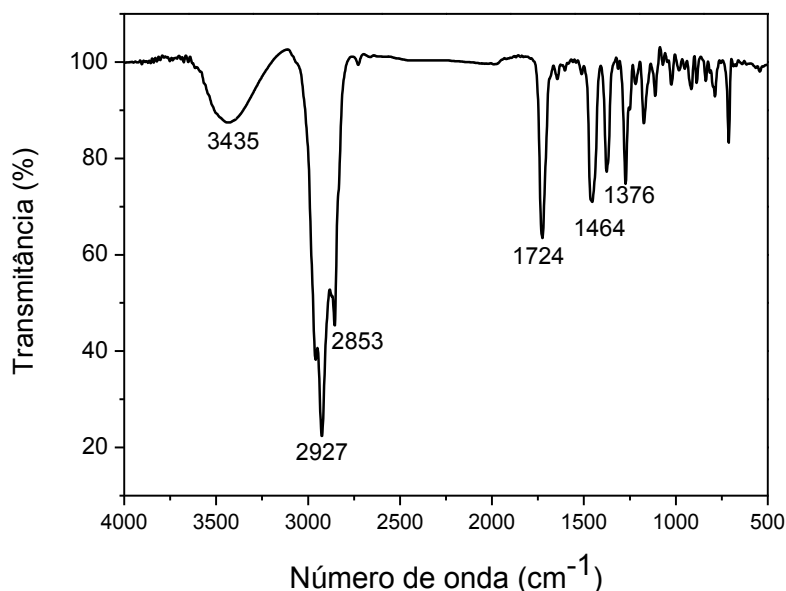
O biopolímero ϵ -PLL é uma amida secundária, e o seu espectro de IVTF (Figura 17) apresenta uma banda intensa em 1649 cm^{-1} referente a C=O. As amidas secundárias apresentam uma banda do estiramento e de dobramentoda ligação N–H. Esses valores são observados em 3249 cm^{-1} 1532 cm^{-1} , respectivamente. A intensidade da banda em 1532 cm^{-1} é atribuída a combinação do estiramento C–N com o dobramento N–H (MAEDA et al., 2003).

Figura 16: Espectro de IVTF do polímero PCL

Figura 17: Espectro de IVTF do polímero ϵ -PLL

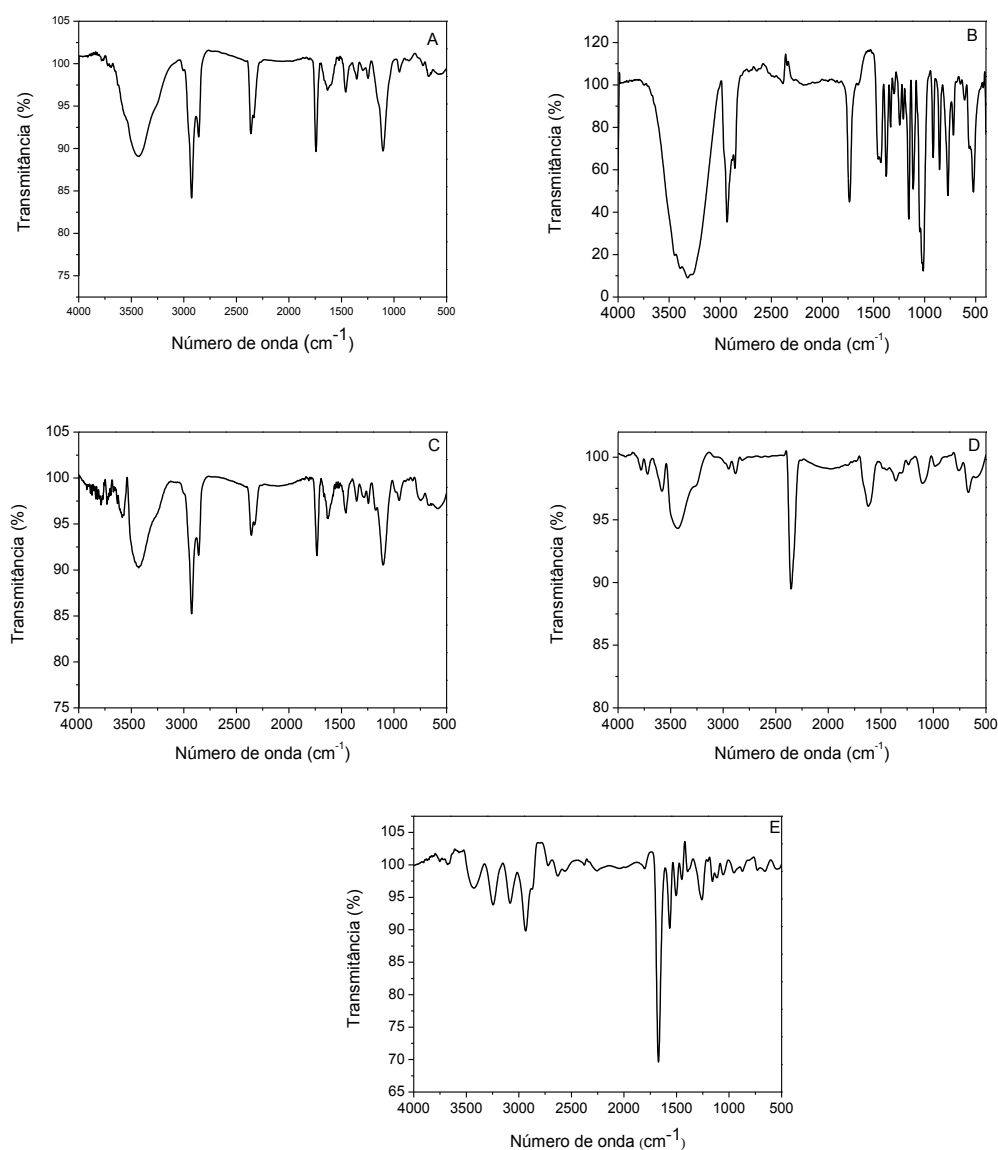
A Figura 18 mostra o IVTF do óleo essencial de *M. a alternifolia*. As bandas observadas são referente ao terpinen-4-ol, que é o componente majoritário presente na composição. Observa-se uma banda intensa e larga em 3435 cm^{-1} característico do grupamento O–H de álcool. As bandas em 2927 e 2853 cm^{-1} são referentes ao estiramento assimétrico e simétrico, respectivamente, do grupos metila ($-\text{CH}_3$). A ligação C=C é identificado pela banda em 1724 cm^{-1} , referente ao estiramento dessa ligação. As bandas em 1464 cm^{-1} e 1376 cm^{-1} são caraterísticas do dobramento da ligação $-\text{CH}_2$.

Figura 18: Espectro de IVTF do óleo essencial de *M. alternifolia*



A Figura 19 mostra os IVTF das suspensões de nanocápsulas NC-0 (nanocápsulas controle), NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*), NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia* revestidas com ϵ -PLL), NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL) e das micropartículas de ϵ -PLL. A análise espectral das suspensões de nanocápsulas e das micropartículas de ϵ -PLL, indicou que os picos característicos de cada material mantiveram-se quase que inalterados sugerindo então, que não ocorreram interações moleculares que alterassem a estrutura química de cada componente, durante o processo de produção das partículas.

Figura 19: Espectro de IVTF das suspensões de nanocápsulas NC-0 (A), NC-1 (B), NC-2 (C), NC-3 (D) e micropartículas de ϵ -PLL (E)



5.5 Identificação e quantificação do terpinen-4-ol no óleo essencial de *M. alternifolia* por cromatografia gasosa

O óleo essencial dessa espécie contém aproximadamente 100 componentes, dos quais terpinen-4-ol, 1,8-cineol, α -terpineol, terpinoleno e o α e γ -terpineno, compreendem cerca de 90 % da constituição do óleo essencial (BROPHY et al., 1989). Nas Figuras 20 e 21 estão demonstrados os cromatogramas do terpinen-4-ol e do óleo essencial de *M. alternifolia* utilizado para obtenção das suspensões de nanocápsulas. É indicado que a substância terpinen-4-ol é a principal responsável pelas propriedades medicinais do óleo essencial de *M. alternifolia*.

(RUSSEL; SOUTHWELL, 2002), por isso as concentrações dos outros componentes do óleo essencial não foram evidenciadas no cromatograma.

Figura 20: Cromatograma do terpinen-4-ol

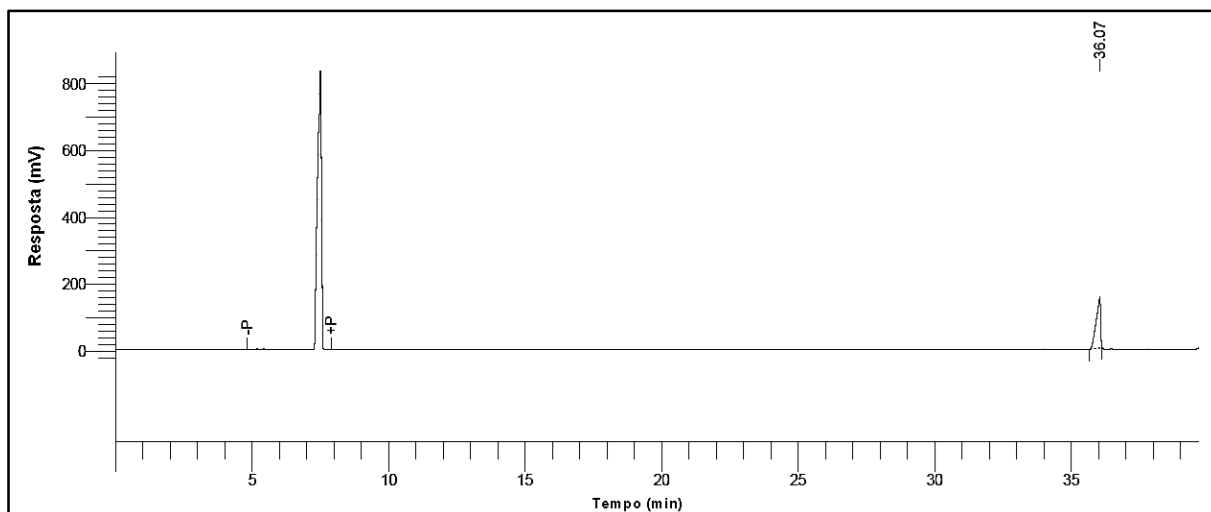
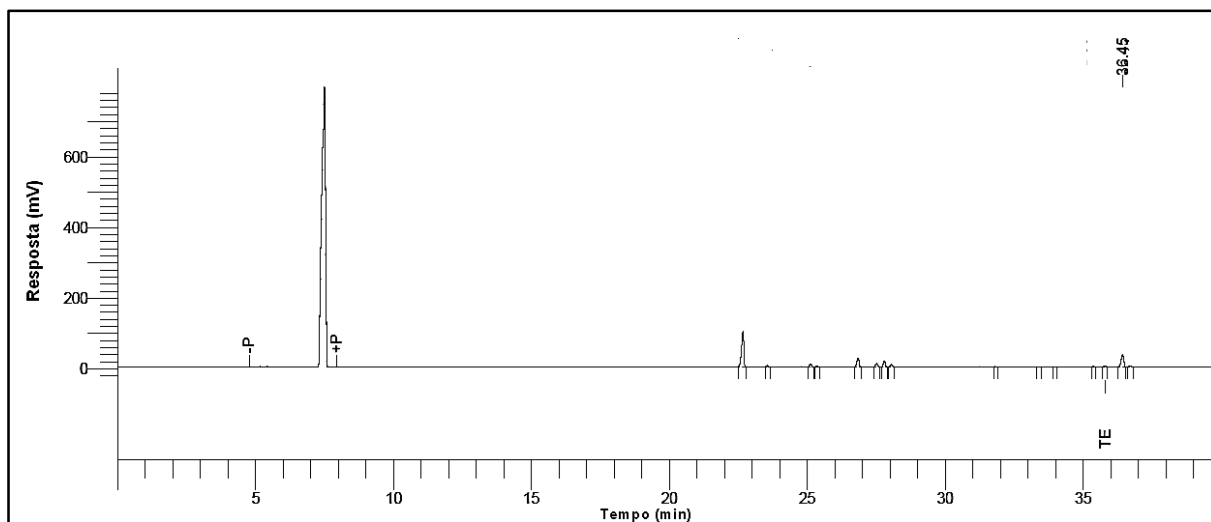


Figura 21: Cromatograma do óleo essencial de *M. alternifolia*



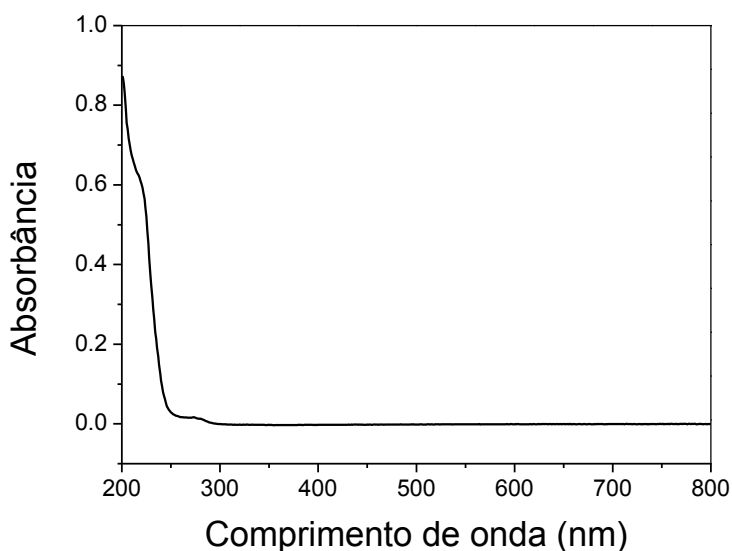
A partir dos cromatogramas apresentados nas Figuras 20 e 21 foi possível calcular a concentração de terpinen-4-ol no óleo essencial de *M. alternifolia* adquirido para o presente estudo. A concentração encontrada para o terpinen-4-ol no óleo foi de 17,67 % $\pm$ 0,09. Pela ISO 4730, o óleo essencial de *M. alternifolia* comercial deve ter concentração mínima de 30% de terpinen-4-ol. Desta forma, o óleo essencial utilizado neste estudo não apresenta composição semelhante à composição padrão

do óleo essencial desta espécie. Segundo Brophy et al. (1989) essa concentração baixa de terpinen-4-ol pode estar relacionada ao processo de destilação do óleo essencial. Os 30 minutos iniciais da destilação concentram uma maior percentagem de terpinen-4-ol.

5.6 Determinação do comprimento de onda (λ) de máxima absorção do óleo essencial de *M. alternifolia*

Para o desenvolvimento e validação do método analítico, e posterior quantificação do óleo essencial de *M. alternifolia* nas suspensões de nanocápsulas, foi determinado o comprimento de onda (λ) de máxima absorção do óleo essencial de *M. alternifolia*. Foi preparada uma solução do óleo essencial em etanol e feito uma varredura entre 200 a 800 nm (Figura 22). Observou-se uma absorção mais intensa em 204 nm.

Figura 22: Espectro de absorção UV-Vis do óleo essencial de *M. alternifolia*

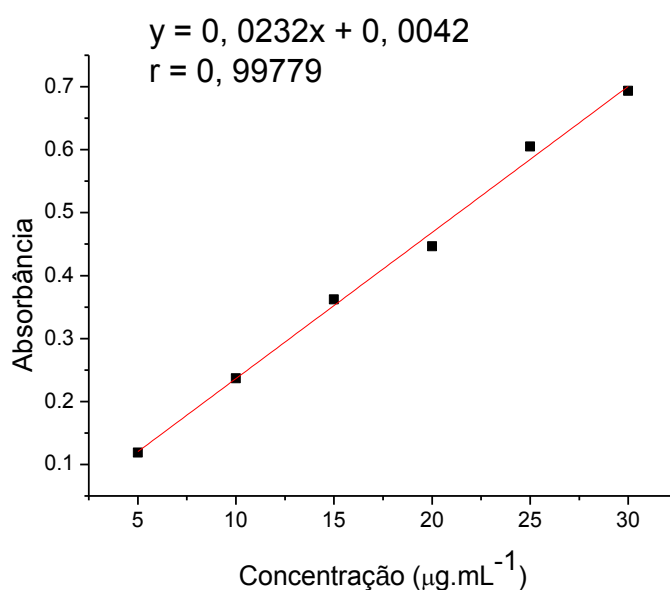


5.7 Validação do método analítico por espectroscopia UV-Vis para quantificação do óleo essencial de *M. alternifolia*

A linearidade foi avaliada em seis níveis de concentração 5, 0; 10, 0; 15, 0; 20, 0; 25, 0 e 30, 0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Considerando as cinco curvas analíticas elaboradas para a determinação quantitativa do óleo essencial de *M. alternifolia*, o estudo de linearidade por meio do cálculo da equação de regressão e do coeficiente de correlação (r), pelo método dos mínimos quadrados, gerou um $r = 0,99779$, indicando uma regressão linear significativa, de acordo com os valores preconizados pelas normas vigentes. A Figura 23 ilustra a curva analítica média obtida para quantificação do óleo em solução etanólica, apresentando a equação.

Com os dados provenientes da avaliação de linearidade, foram calculados os limites de detecção e de quantificação, por meio das Equações 2 e 3, respectivamente. O valor obtido para o LD foi $0,63 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para o LQ foi $1,90 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O LD é definido como a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, enquanto o LQ representa a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Figura 23: Curva analítica óleo essencial de *M. alternifolia* em etanol em 204 nm



A precisão é uma medida do erro relativo do método, expressa como coeficiente de variação (CV), em termos de repetitividade e precisão intermediária. Para análise da repetibilidade, três concentrações de óleo essencial de *M. alternifolia* (10, 0; 20, 0 e 30, 0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram preparadas e analisadas em triplicata no mesmo dia, enquanto para a precisão intermediária as mesmas concentrações foram preparadas e analisadas em três dias consecutivos.

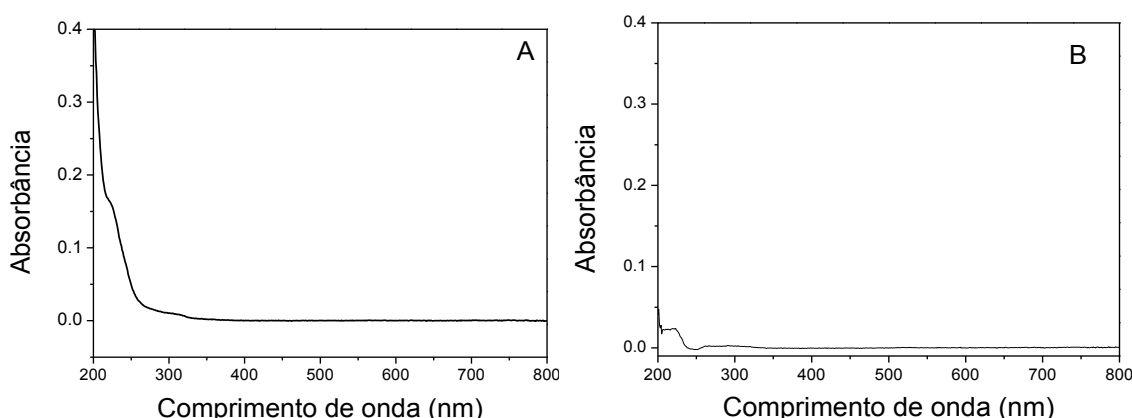
Os resultados de repetitividade e de precisão intermediária, expressos em termos de concentração medida ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) $\pm$ DP e coeficiente de variação (CV), estão apresentados na Tabela 8. Para ambos os estudos, os valores de CV foram inferiores a 5%, demonstrando a repetitividade e a precisão intermediária do método analítico empregado (ANVISA, 2003).

Tabela 8: Valores experimentais obtidos nos ensaios de repetitividade e precisão intermediária

Solução padrão ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração quantificada $\pm$ DP ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CV (%)
Análise de repetitividade (n=3)		
10, 0	10, 53 $\pm$ 0, 52	4, 97
20, 0	23, 12 $\pm$ 1, 01	4, 37
30, 0	35, 48 $\pm$ 1, 40	3, 94
Precisão Intermediária (n=3)		
Dia 1		
10, 0	10, 68 $\pm$ 0, 23	2, 13
20, 0	22, 50 $\pm$ 0, 16	0, 72
30, 0	34, 35 $\pm$ 0, 52	1, 51
Dia 2		
10, 0	10, 90 $\pm$ 0, 38	3, 51
20, 0	23, 99 $\pm$ 0, 84	3, 51
30, 0	36, 85 $\pm$ 0, 28	0, 58
Dia 3		
10, 0	9, 74 $\pm$ 0, 44	4, 53
20, 0	19,17 $\pm$ 0,64	0, 33
30, 0	30, 20 $\pm$ 0, 32	1, 07

A especificidade do método foi avaliada por comparação dos espectros da suspensão NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*) e NC-0 (nanocápsulas controle). Para esse efeito, o ultrafiltrado obtido após centrifugação das suspensões foi diluído em etanol e analisado pelo método de espectrofotometria de UV-Vis descrito. O espectro da suspensão NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*) (Figura 24-A) mostrou uma banda de absorção próximo a 204 nm. Enquanto que no espectro do ultrafiltrado obtido a partir da suspensão NC-0 (nanocápsulas controle) (Figura 24-B), não foi observado nenhuma banda neste mesmo comprimento de onda. Esse resultado indica que não houve interferência na determinação quantitativa de óleo essencial de *M. alternifolia* a partir dos componentes da formulação.

Figura 24: Espectro de absorção UV-vis da suspensão NC-1 (A) e NC-0 (B)



5.8 Determinação da eficiência de encapsulação do óleo essencial de *M. alternifolia* nas suspensões de nanocápsulas

O método analítico desenvolvido e validado, foi utilizado para avaliar a eficiência de encapsulação do óleo essencial de *M. alternifolia* na suspensão NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*). A eficiência de encapsulação foi determinada pelo método indireto, onde a quantificação é realizada medindo a concentração de óleo não encapsulado.

O método de deposição interfacial de um polímero pré-formado mostrou-se eficiente para a encapsulação do óleo essencial. O valor calculado para eficiência de encapsulação foi de $99,86\% \pm 0,038$, com coeficiente de variação de $0,038\%$.

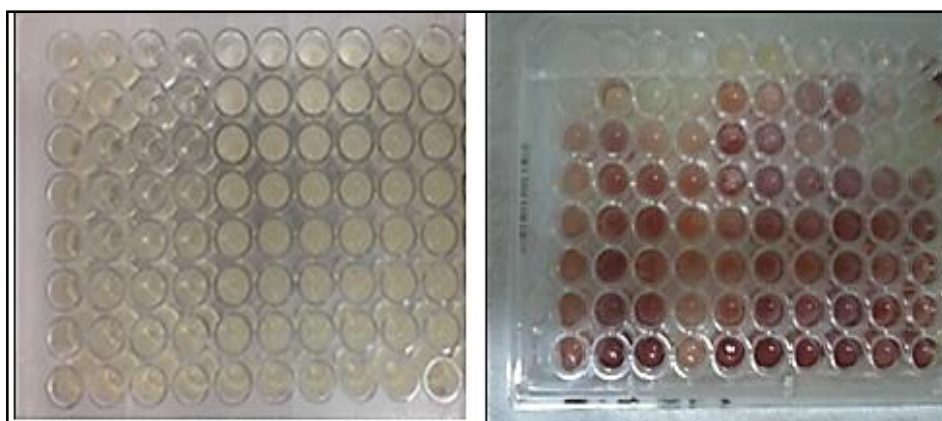
Não há relatos na literatura sobre a avaliação da eficiência de encapsulação do óleo essencial de *M. alternifolia* em sistemas nanoestruturados pelo método de espectrofotometria UV-Vis. No entanto, alguns pesquisadores descreveram esse parâmetro para outros fármacos lipofílicos usando o método de deposição interfacial de um polímero pré-formado. Blouza et al. (2006) desenvolveram e caracterizaram nanocápsulas de PCL com espironolactona para uso pediátrico em escala laboratorial e industrial, obtendo percentagens de EE de 96, 21 e 90, 56%, respectivamente. No trabalho de Noronha et al. (2013), foram produzidas nanocápsulas de PCL contendo α -tocoferol as quais revelaram EE variando de 75, 55 a 99, 97%.

O método de deposição interfacial de um polímero pré-formado, de acordo com a literatura, é um dos que apresentam os melhores resultados para a EE, alcançando valores iguais ou superiores a 80% (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Dessa forma, as formulações desenvolvidas no presente trabalho apresentaram valores condizentes aos estudos já realizados, utilizando a PCL como polímero.

5.9 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para uma determinação visual da CIM foi utilizando o corante TTC. A mudança de coloração ocorre nos poços onde não houve ação dos agentes antimicrobianos (Figura 25). Essa mudança de coloração é devido ao processo de oxirredução do corante TTC, pois os micro-organismos vivos reduzem o TTC através de enzimas, originando 1,3,5-trifenilformazan que acumula-se no interior dos grânulos das células e torna-os vermelhos (GABRIELSON et al., 2002).

Figura 25: Preparação das microplacas e leitura após aplicação do TTC



Os resultados do estudo da CIM, CBM e CFM do óleo essencial de *M. alternifolia*, do terpinen-4-ol, do polímero ϵ -PLL, das micropartículas de ϵ -PLL e das suspensões NC-0 (nanocápsulas controle), NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*), NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia* revestidas com ϵ -PLL) e NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL), frente às cepas do *E. coli*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, estão dispostos na Tabela 9 e 10, sendo que a CIM foi interpretada como sendo a menor concentração dos agentes antimicrobianos testados capaz de inibir o crescimento visível de um organismo após um período de incubação de 24 horas, enquanto que a CBM referiu-se a concentração capaz de impedir o crescimento dos micro-organismos (ANDREWS, 2001).

Tabela 9: Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Antimicrobianos	CIM (mg.mL ⁻¹)				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Óleo essencial de <i>M.alternifolia</i>	27, 66	27, 66	110, 63	221, 25	110, 63
Terpinen-4-ol	< 3, 65	29,19	< 3, 65	58, 38	< 3, 65
Solução de ϵ -PLL	0, 25	0, 50	-	-	0, 063
Solução de micropartículas de ϵ -PLL	0, 33	0, 33	0, 22	0, 22	0, 016
NC-0	-	-	-	-	-
NC-1	18, 52	8, 23	18, 52	41, 66	6, 25
NC-2	12, 84	5, 70	19, 25	19, 25	3, 25
NC-3	0, 74	0, 74	0, 74	1, 67	0, 50

(-) Não apresentaram atividade bacteriostática

NC-0 (nanocápsulas controle); NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M.alternifolia*); NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M.alternifolia* revestidas com ϵ -PLL); NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL).

Tabela 10: Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

CBM e CFM (mg.mL ⁻¹)					
Antimicrobianos	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	221, 25	55, 31	110, 63	442, 50	110, 63
Terpinen-4-ol	< 3, 65	29, 19	< 3, 65	233, 50	< 3, 65
Solução de ϵ -PLL	-	1, 00	-	-	0, 063
Solução de micropartículas de ϵ - PLL	0, 33	0, 33	0, 33	0, 22	0, 031
NC-0	-	-	-	-	-
NC-1	-	41, 67	41, 67	-	12, 50
NC-2	-	28, 90	43, 30	-	13, 00
NC-3	-	1, 67	-	-	0, 5

(-) Não apresentaram atividade bactericida ou fungicida

NC-0 (nanocápsulas controle); NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M.alternifolia*); NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M.alternifolia* revestidas com ϵ -PLL); NC-3 (nanocápsulas controle revestidas com ϵ -PLL).

O óleo essencial de *M. alternifolia* apresentou atividade antimicrobiana tanto para bactérias Gram positivas (*S. aureus* e *S. pyogenes*) como para bactérias Gram negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e para a levedura (*C. albicans*). Na maioria das vezes o óleo essencial exibe ação bactericida, mas em concentrações mais baixas apresenta apenas ação bacteriostática (CARSON et al., 2008). Os valores encontrados são maiores do que os descritos na literatura, isso se deve ao fato da concentração de terpinen-4-ol ser menor do que o esperado. A concentração de 17 % de terpinen-4-ol compromete a ação antimicrobiana do óleo essencial, mas este ainda apresentou atividade bactericida para todos os micro-organismos testados.

O mecanismo de ação bactericida o óleo essencial de *M. alternifolia* consiste no comprometimento da integridade da membrana celular, consequente perda de material intracelular, incapacidade de manter a homeostase e inibição da respiração (CARSON; RILEY; HAMMER, 2006). Contudo, por possuir cerca de 100 componentes, existe a possibilidade de não ter sido pesquisado todo o potencial de

atuação. É possível que outros elementos, ainda não avaliados, contribuam para a atividade antimicrobiana com mecanismo de ação diferente daquele já encontrado (HAMMER et al., 2003).

Cox et al. (2000) observaram a eficácia do óleo essencial de *M. alternifolia* para *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* e confirmaram que a atividade antimicrobiana se deve à capacidade de romper a barreira de permeabilidade da membrana dos micro-organismos, inibindo a respiração.

Neste trabalho foi avaliado a atividade antimicrobiana do terpinen-4-ol, com base em observações preliminares que indicam que ele é um dos componentes principais responsáveis por essa atividade. Ao avaliar os resultados obtidos, o padrão de terpinen-4-ol apresenta valores de CIM, CBM e CFM menores que o óleo essencial de *M. alternifolia*. Esse resultado também foi observado por MONDELLO et al. (2006) e LEE et al. (2013), onde foi avaliada a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. alternifolia*, do terpinen-4-ol e do 1,8-cineol. O terpinen-4-ol é um dos responsáveis pela eficácia antibacteriana do óleo essencial de *M. alternifolia*, enquanto que os componentes secundários como o 1,8-cineol também contribuem para a sua eficácia, devido ao fato de aumentar a permeabilidade da membrana facilitando a entrada de outros agentes antimicrobianos (CARSON; MEE; RILEY, 2002; GROPPA, 2002; HAMMER; CARSON; RILEY, 2003).

A suspensão NC-C (nanocápsulas controle) não apresentou atividade antimicrobiana, isso era esperado, pois não há estudos relatando a atividade antimicrobiana da PCL e dos triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico.

A incorporação do óleo essencial de *M. alternifolia* nas suspensões de nanocápsulas não resultou em perda de sua atividade. Isso demonstra que a metodologia e os materiais empregados não interferiram na ação antimicrobiana do óleo essencial, uma vez que, de acordo com a literatura, a ação antimicrobiana do mesmo pode sofrer interferência negativa pela presença de tensoativos e pelos constituintes orgânicos dos meios de cultura (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999).

As suspensões NC-1 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*), NC-2 (nanocápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia* revestidas com ϵ -PLL) apresentaram atividade antimicrobiana, com valores de CIM, CBM e CFM menores do que para o óleo essencial não encapsulado. Isso demonstra que mesmo o óleo essencial não apresentando a concentração de terpinen-4-ol desejada, ainda possui atividade antimicrobiana e quando encapsulado tem sua

atividade melhorada. Esses valores menores de CIM, CBM e CFM das nanocápsulas pode ser atribuída à presença da parede polimérica, pelo fato dos polímeros apresentarem uma tendência em adsorver na membrana do micro-organismo através de mecanismos estéricos e eletrostáticos (LBOUTONE et al., 2002). Tal adsorção direciona o fármaco para o local de ação, ou seja, para as estruturas específicas do micro-organismo (NHUNG et al, 2007).

A ϵ -PLL tem um amplo espectro antimicrobiano contra micro-organismos, incluindo leveduras, fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (LI et al., 2014). A solução de ϵ -PLL apresentou atividade bacteriostática frente a cepa *E. coli*, *S. pyogenes* e *P. aeruginosa* e bactericida frente a *S. aureus* e a *C. albicans*. Esse resultado foi encontrado também por Li et al. (2014).

Ao comparar os resultados de CIM, CBM e CFM obtidos para as micropartículas de ϵ -PLL, com a solução do polímero, observa-se uma diferença entre os resultados. As micropartículas apresentaram ação bactericida para todos os micro-organismos testados. Essa diferença da atividade antimicrobiana entre o polímero e as micropartículas vem sendo investigada. Segundo Shima et al. (1984), a atividade antimicrobiana da ϵ -PLL está relacionada diretamente com o tamanho da partícula e a quantidade de resíduos de L – lisina presente no polímero. Em virtude disso, era esperado que as micropartículas tivessem um comportamento antimicrobiano diferente do polímero de ϵ -PLL.

Esse aumento na eficácia dos sistemas micro ou nanoparticulados pode ser explicado pela tendência que os polímeros têm de adsorver na interface, devido aos mecanismos eletrostáticos e às suas propriedades superficiais hidrofóbicas. O tamanho reduzido das partículas favorece a deposição de um maior número de partículas na superfície, expondo assim uma maior quantidade de substância ativa. Além disso, as interações dos sistemas coloidais com as membranas dos micro-organismos pode promover a difusão contínua dos agentes antimicrobianos dentro da membrana (FLORES et al., 2013).

6 CONCLUSÃO

As micropartículas de ϵ -PLL poliméricas obtidas pelo método de secagem por aspersão (spray drying) e apresentaram formato esférico e liso, com o rendimento esperado de 42, 4 % com potencial zeta de +8, 2 mV e pH em torno de 5,1.

O método de deposição interfacial de um polímero pré-formado foi adequado para a obtenção das suspensões de nanocápsulas de PCL contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel, resultando em nanocápsulas com diâmetro médio entre 160 nm a 200 nm, baixo índice de polidispersividade, potencial zeta negativo e com ótimo percentual de encapsulação (99,86%).

A ϵ -PLL foi adsorvida nas nanocápsulas obtidas que, após esse revestimento apresentou um potencial zeta positivo, demonstrando que o processo de adsorção ocorreu.

A concentração encontrada de terpinen-4-ol pela análise de cromatografia gasosa no óleo essencial de *M. alternifolia* foi de 17,67 %, valor abaixo do determinado pela ISO 4730.

O método analítico desenvolvido e validado, mostrando-se linear, específico e preciso, permitindo a quantificação da eficiência de encapsulação do óleo essencial de *M. alternifolia*.

O óleo essencial de *M. alternifolia* mostrou atividade antimicrobiana para os micro-organismos testados mesmo não apresentando a composição de acordo com a ISO 4730.

O óleo essencial de *M. alternifolia* quando encapsulado teve um desempenho bactericida superior ao apresentado pelo óleo essencial não encapsulado. Com os resultados obtidos, a suspensão de nanocápsulas contendo o óleo essencial de *M. alternifolia* demonstrou ser uma alternativa promissora para agentes antimicrobianos, agregando características importantes como tamanho nanométrico de partícula, aumento no tempo de permanência e aderência no local da infecção.

As micropartículas de ϵ -PLL apresentaram melhor atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testados, podendo ser considerado um agente antimicrobiano em potencial.

REFERÊNCIAS

ADAMIEC, J., MODRZEJEWSKA, Z. Some Structural Properties of Spray-Dried Chitosan Micro granules. **Drying Technology**, v. 23, p. 1601–1611, 2005.

AHMAD, M. et al. Pharmaceutical microencapsulation technology for development of controlled release drug delivery systems. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 75, p. 384-387, 2011.

AL-OMRAN, M. F. et al. Taste masking of diclofenac sodium using microencapsulation. **Journal of Microencapsulation**, v.19, n. 1, p. 45-52. 2002.

AMARAL, A. C.; BOCCA, A. L.; RIBEIRO, A. M.; et al. Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 3, p. 526–33, 2009.

AMASS, W.; AMASS, A.; TIGUE, B. A review of biodegradable polymer: uses current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable and recent advances in biodegradation studies. **Polymer International**, v. 17, p. 89-144, 1998.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5–16, 2001.

ANSARI, K. A. et al. Cyclodextrin-based nanosponges for delivery of resveratrol: in vitro characterization, stability, cytotoxicity and permeation study. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12, n. 1, p. 279-286, 2011.

ANSON, F. C.; SAVEANT, J. M.; SHIGEHARA, K. Kinetics of mediated electrochemical reactions at electrodes coated with redox polymer-films. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 145, n. 2, p. 423-430, 1983.

ANTUNES, R. M. P. et al. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 4, p. 517–524, 2006.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília: 02 de julho de 2003.

ASANO, A.; TANAKA, C.; MURATA, Y. NMR determination of crystallinity for poly (ϵ -l-lysine). **Polymer**, v. 48, n. 13, p. 3809–3816, 2007.

AVADI, M. R. et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 58–63, 2010.

BANKAR, S. B.; SINGHAL, R. S. Panorama of poly- ϵ -lysine. **RSC Advances**, v. 3, n. 23, p. 8586-8603, 2013.

BENITA, S. Microencapsulation: methods and industrial applications. **In: Drugs and pharmaceutical sciences**. 2^o ed, Taylor & Francis Group, New York, v.73, p. 1- 122, 2006.

BLOUZA, I. L. et al. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for pediatric use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, p. 124-131, 2006.

BO, T. et al. Metabolomic Analysis of Antimicrobial Mechanisms of ϵ Poly L lysine on *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 4454–4465, 2014.

BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. 1-2, p. 241–51, 2004.

BIJU, S. S. et al. A validated HPTLC method for determination of tea tree oil from cosmeceutical formulations. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 38, n. 1, p. 41–4, 2005.

CALVO, P. et al. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v.63, p. 125-132, 1997a.

CALVO, P. et al. Development of positively charged colloidal drug carriers : chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. **Colloids and Polymer Science**, v. 275, p. 46–53, 1997b.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 153, p. 41-50, 1997.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 5, p. 530–536, 1996.

CARSON, C.F. et al. Use of deception to achieve double- blinding in a clinical trial of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil for the treatment of recurrent herpes labial. **Contemporary Clinical Trials**, v. 29, p. 9-12, 2008.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50–62, 2006.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.6, p.1914-1920, 2002.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V.; COOKSON, B.D. Efficacy and safety of tea tree oil as a topical antimicrobial agent. **Journal of Hospital Infection**, v. 40, p. 175-178, 1998.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. Broth micro dilution method for determining the susceptibility of *E.coli* and *S.aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Microbios**, v. 82, p. 181–185, 1995.

CASTRO C. et al. Análise econômica do cultivo e extração do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Revista Árvore**, v. 29, n. 2, p. 241-249, 2005.

CHACON, M. et al. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.8, n.2, p. 99-107. 1999.

COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 7, p. 1417–1450, 2006.

COX, S.D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 1, p.170-5, 2000.

DASH, T. K.; KONKIMALLA, V. B. Poly- ϵ - caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering : A review. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 1, p. 15–33, 2012.

DELLIT, T. H. et al. Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America Guidelines for Developing an Institutional Program to Enhance Antimicrobial Stewardship. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p. 159–177, 2007.

DHIRENDRA, K. et al. Solid Dispersions: A Review. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, v. 22, p. 234-246, 2009.

DUNNE, M. et al. Encapsulation of protamine sulphate compacted DNA in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 92, p.209-219, 2003.

ESPUELAS, M.S. et al. P. Poly(ϵ -caprolacton) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 158, p. 19-27, 1997.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1–R4, 1989.

FLORES, F. C. et al. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, v. 175, p. 281–286, 2013.

FLORES, F. C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: Protection Against Volatilization. **Quimica nova**, v. 34, n. 6, p. 968–972, 2011.

GABRIELSON, J. et al. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 63-73, 2002.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 330–347, 2004.

GRAF, R., M. et al. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEGchain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 18, p. 301-313, 2000.

GRAF, R. et al. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 215–233, 1995.

GRAF, R. et al. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. **Science**, v.263, p.1600-1603, 1994.

GROPPO, F.C. et al. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. **International Dental Journal**, v.52, n.6, p.433-437, 2002.

HAJIPOUR, M. J. et al. Antibacterial properties of nanoparticles. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 499–511, 2012.

HALCON, L.; MILKUS, K. and wounds: A review of tea tree oil as a promising antimicrobial. **American Journal of Infection Control**, v. 32, n. 7, p. 402–408, 2004.

HAMMER, K.A. et al. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. **Oral Microbiology and Immunology**, v.18, p. 389-392, 2003.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.50, p.195-199, 2002.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Influence of organic matter, cations and surfactants on the antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 446-452, 1999.

HARKENTHAL, M. et al. Comparative study on the in vitro antibacterial activity of Australian tea tree oil, cajuput oil, niaouli oil, manuka oil, kanuka oil and eucalyptus oil. **Pharmazie**, v. 54, p. 460-463, 1999.

HART, P. H. et al. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflammation Research**, v. 49, p. 619–626, 2000.

HASSELMANN, C. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. **Clinical microbiology and infectious diseases**, v. 9, p. 1–7, 2003.

HO, C. H. et al. Conventional and microwave-assisted synthesis of hyperbranched and highly branched polylysine towards amphiphilic core–shell nanocontainers for metal nanoparticles. **Polymer**, v. 53, n. 21, p. 4623–4630, 2012.

HO, C. H. et al. Ways of selective polycondensation of L-lysine towards linear α - and ϵ -poly-L-lysine. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 46, n. 15, p. 5053–5063, 2008.

HOSSEINI, S. F. et al. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 50–56, 2013.

International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: Q2B – **Validation of Analytical procedures: methodology**, 2005.

International Organization for Standardization. ISO 4730:2004. **Oil of Melaleuca, terpinen-4-ol type (tea tree oil)**. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2004.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying. **Drying Technology**, v. 26, p. 816–835, 2008.

JAIN, R. et al. Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparative by approaches. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n.8, p. 703-727, 1998.

KAWAGUCHI, H. Functional Polymer Microspheres. **Progress in Polymer Science**, v. 25, p. 1171-1212, 2000.

KAWASHIMA, Y. et al. Uniform and Improved Bioavailability of Newly Developed Rapid and Sustained Release Suspensions of Ibuprofen Microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 89, p. 9-17, 1993.

KAYE, K. et al. Risk Factors for Emergence of Resistance to Broad-Spectrum Cephalosporins among *Enterobacter* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2628–2630, 2001.

KIM, S. et al. Preparation and physicochemical characterization of trans-resveratrol nanoparticles by temperature-controlled antisolvent precipitation. **Journal of Food Engineering**, v. 108, p. 37-42, 2012.

KNIGHT, T. E.; HAUSEN, B. M. Melaleuca oil (tea tree oil) dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 30, p. 423-427, 1994.

KOLLEF, M. H, FRASER, V. J. Antibiotic resistance in the intensive care unit. **Annals of Internal Medicine**, v. 134, n. 4, p. 134-298, 2001.

KREUTER, J. et al. Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the blood–brain barrier using surfactant-coated nanoparticles. **Journal of Control Release**, v. 49, p. 81–87, 1997.

LAMBERT, G. et al. Polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core as a novel colloidal carrier for the delivery of oligonucleotides. **Pharmaceutical Research**, v. 17, p. 707-714, 2000.

LASIC, D.D. Novel application of liposomes. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 307-321, 1998.

LBOUTOUNNE, H. et al. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a Digluconate. **Journal of Controlled Release**, v. 82, p. 319–334, 2002.

LEE, C. J. et al. Correlations of the components of tea tree oil with its antibacterial effects and skin irritation. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 21, n. 2, p. 169–176, 2013.

LEEKHA, S.; TERRELL, C. L.; EDSON, R. S. General Principles of Antimicrobial Therapy. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 2, p. 156–167, 2011.

LI, Y. Q. et al. Antibacterial characteristics and mechanisms of ϵ -poly-lysine against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Controlled**, v. 43, p. 22–27, 2014.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n.4, p. 670-673, 2004.

MAEDA, S. et al. Characterization of microbial poly (ϵ -l-lysine) by FT-IR, Raman and solid state ^{13}C NMR spectroscopies. **Journal of Molecular Structure**, v. 655, n. 1, p. 149–155, 2003.

MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. P. D.; EVANGELISTA, R. C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 523-530, 2006.

MOHAMMADI, G. et al. Physicochemical and anti-bacterial performance characterization of clarithromycin nanoparticles as colloidal drug delivery system. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 88, n. 1, p. 39–44, 2011.

MOHANRAJ, V.J., CHEN, Y. Nanoparticles – a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, p. 561-573, 2006.

MONDELLO, F. et al. In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, p. 158, 2006.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113–142, 2010.

MOSQUEIRA, V. C. et al. Biodistribution of long-circulating Peg-grafted nanocapsules in mice: effects of Peg chain length and density. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 10, p. 1411-1419, 2001.

MOSQUEIRA, V. C. et al. Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Prepared by a Solvent Displacement Process: Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 5, p. 614–626, 2000.

NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Chitosan Nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 11, p. 1423-1430, 2010.

NCCLS. **National Committee for Clinical Laboratory**. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard - M7-A6, 6 ed, v. 23. 2003.

NECKEL, G. L.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de nanocápsulas contendo camptotecina a partir do poli (D,L-lático) e copolímeros diblocos do poli (D,L-lático) e polietilenoglicol. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, p. 504-511, 2005.

NEVES, A. R. et al. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. **Int Journal of Nanomedicine**, v. 8, p.177-187, 2013.

NHUNG, D. T. T. et. Al. Sustained antibacterial effect of a hand rub gel incorporating chlorhexidine-loaded nanocapsules (Nanochlorex®). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 334, p. 166–172, 2007.

NISHIKAWA, M.; OGAWA, K. Inhibition of epsilon-poly-L-lysine biosynthesis in Streptomyetaceae bacteria by short-chain polyols. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2306–2312, 2006.

NORONHA, C. M. et al. Optimization of α -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 896-903, 2013.

OLIVA, B. et al. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 185-187, 2003.

OYARZUN-AMPUERO. F.A. et al. A new drug nanocarrier consisting of polyarginine and hyaluronic acid. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 54–57, 2011.

PAVIA, D.L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 4º ed. Cengage Learning, São Paulo, 2010.

PANDEY, R. et al. Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 83, p. 373–378, 2003.

PATEL, N. R. et al. Itraconazole loaded poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles for improved antifungal activity. **Nanomedicine**, v. 5, n. 7, p. 1037–1050, 2010.

PATERSON, D. L. et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2206–2212, 2001.

PELTONEN, L. et al. Improved entrapment efficiency of hydrophilic drug substance during nanoprecipitation of poly(l)lactide nanoparticles. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 5, p. 1–6, 2004.

PEREIRA, F. C. et al. Modification of glassy carbon electrodes with a poly-Llysine/ glutaraldehyde film. **Electroanalysis**, v. 16, n. 17, p. 1439–1443, 2004.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 4, p. 447–451, 2001.

PÍSECKY, J. Spray drying in the cheese industry. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 531–536, 2005.

POHLMANN, A. R. et al. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 305–312, 2002.

QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 1113–1128, 1998.

RAFFIN, R. P. et al. Preparation, characterization, and in vivo anti-ulcer evaluation of pantoprazole-loaded microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 2, p. 198–204, 2006.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5^o ed. Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, p. 904, 2004.

REIS, C. P. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**, p. 8–21, 2006.

RIEKES, M. K. et al. Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. **Materials Science and Engineering**, v. 31, p. 962–968, 2011.

RISCH, S. J. **Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients**. In *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*. ACS Symposium Series. Washington. p. 2–7, 1995.

ROA, J. P. B. et al. Síntese e caracterização do copolímero poli(3-hidroxibutirato-co- ϵ -caprolactona) a partir de poli(3-hidroxibutirato) e poli(ϵ -caprolactona). **Polímeros**, v. 20, n. 3, p. 221-226, 2010.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu; p. 118, 2006.

RUSSEL, M.; SOUTHWELL, I. Monoterpenoid accumulation in *Melaleuca alternifolia* seedlings. **Phytochemistry**, v. 59, p. 709-716, 2002.

SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, p. 621-632, 2005.

SANTOS, S. S. et al. Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 270-276, 2014.

SCHAFFAZICK, S.R. et al. Freeze-drying Polymeric Colloidal Suspensions: Nanocapsules, Nanospheres and Nanodispersion. A Comparative Study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 17, n. 3, p. 562-569, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003a.

SCHAFFAZICK, S.R. et al. Freeze-drying Polymeric Colloidal Suspensions: Nanocapsules, Nanospheres and Nanodispersion. A Comparative Study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 501-505, 2003b.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

SALTZMAN, W. **Drug Delivery - Engineering principles for drug therapy**. Oxford University Press: NY, 2001.

SHIH, I.L.; SHEN, M.-H.; VAN, Y.-T. Microbial synthesis of poly(epsilon-lysine) and its various applications. **Bioresource technology**, v. 97, n. 9, p. 1148–1159, 2006.

SHIMA, S. et al. Antimicrobial action of epsilon-poly-L-lysine. **The Journal of Antibiotics**, v. 37, n. 11, p. 1449–1455. 1984.

SHIMA, S.; SAKAI, H. Polylysine Produced by *Streptomyces*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n. 9, p. 1807–1809, 1977.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p. 1-10. 2003.

SINHA, V. R. et al. Poly- ϵ - caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1-23, 2004.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1–20, 2001.

SHU, B. et al. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 664–669, 2006.

TAO, S.L.; DESAI, T.A. Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 315-328, 2003.

THOMPSON, C. J. et al. Evaluation of ibuprofen-loaded microspheres prepared from novel copolyesters. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 329, p. 53-61, 2007.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. Progress in Polymer Science The return of a forgotten polymer — Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, p. 1217–1256, 2010.

ZHANG, F. et al. Polymer-coated nanoparticles: a universal tool for biolabelling experiments. **Small**, v. 7, n. 22, p. 3113–27, 2011.

ZHOU, J; QI, J. Multi-walled carbon nanotubes/epsilon-polylysine nanocomposite with enhanced antibacterial activit. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, p. 76–83, 2011.