



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS I  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

**BEATRIZ PATRÍCIO ROCHA**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO  
DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UM SISTEMA MICROEMULSIONADO  
CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* Cheel**

**CAMPINA GRANDE**

**2019**

BEATRIZ PATRÍCIO ROCHA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO  
DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UM SISTEMA MICROEMULSIONADO  
CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* Cheel**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para a obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

**Área de concentração:** Farmácia

**Orientador:** Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno.

**Coorientadora:** Joandra Máisa da Silva Leite.

**CAMPINA GRANDE**

**2019**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

R672d Rocha, Beatriz Patrício.  
Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação da atividade antimicrobiana de um sistema microemulsionado contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel [manuscrito] / Beatriz Patrício Rocha. - 2019.  
52 p. : il. colorido.  
Digitado.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2019.  
"Orientação : Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, Departamento de Farmácia - CCBS."  
"Coorientação: Profa. Ma. Joandra Maisa da Silva Leite, Departamento de Farmácia - CCBS."  
1. Lesões cutâneas. 2. Microemulsões. 3. Resistência microbiana. 4. Produtos naturais. I. Título  
21. ed. CDD 615.321

BEATRIZ PATRÍCIO ROCHA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO  
DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UM SISTEMA MICROEMULSIONADO  
CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* Cheel**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para a obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

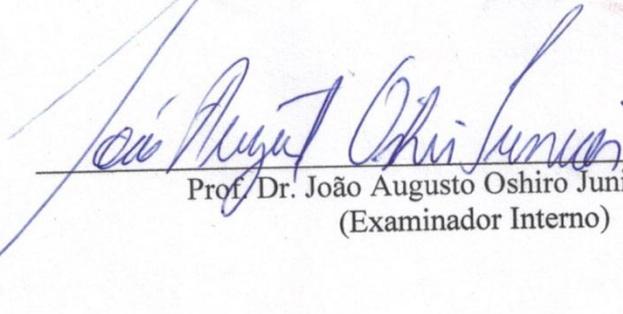
Aprovado em: 19/11/2019.

**BANCA EXAMINADORA**



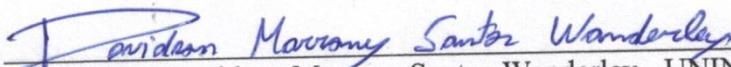
---

Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno - UEPB  
(Orientador)



---

Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior - UEPB  
(Examinador Interno)



---

Prof. Me. Davidson Marrony Santos Wanderley - UNINASSAU  
(Examinador Externo)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar ao meu lado em todos os momentos, pelo o dom da vida, por ter me protegido e guiado sempre, sou grata por todas as vitórias e batalhas.

Em especial a minha base, meus pais Maria Nice e Irenildo, por todo carinho, por todo o amor, por todo o apoio, por me incentivarem ir em busca dos meus sonhos, pela torcida e por todas as orações em meu favor. Não seria a mulher que sou hoje sem eles. Minha eterna gratidão.

Aos meus amigos Camila, Milena, Juliana, Vinicius, Emmily e Yara por todas as risadas, por dividir todos os momentos bons e ruins da graduação, são pessoas que quero levar para sempre em minha vida. Sou muito feliz por ter conhecido vocês, obrigada pela amizade!

As minhas amigas Drielly, Débora e Geisiane pelos longos anos de amizade. Vocês são muito especiais.

Ao meu orientador Bolívar P. G. de L. Damasceno pelo acolhimento nesta etapa final da graduação, pela sua paciência e bondade. Por todas as oportunidades concedidas e ensinamentos.

A Augusto, do Laboratório de microbiologia da UEPB, por sua disponibilidade, humildade e compreensão. Sou muito grata pela sua ajuda.

Agradeço a todos que fazem parte do Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos pelo acolhimento e carinho, em especial a Joandra por todo o auxílio, paciência e contribuições ao longo deste trabalho, e a Amaro por todo o conhecimento compartilhado durante sua pesquisa, como também por toda sua atenção.

Aos professores Davidson M. S. Wanderley e João Augusto O. Junior, profissionais que me inspiram e tenho enorme admiração. Obrigada por aceitarem participar deste momento tão importante.

A Universidade Estadual da Paraíba por todo o suporte, pelas oportunidades de aprendizado e crescimento na minha formação, e a todos os professores, que me instigaram durante toda a caminhada acadêmica.

Por fim a todos que fazem parte da minha vida e contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigada!

“Que o medo de não chegar não lhe impeça de seguir. Que o medo de falhar não lhe faça desistir” (Bráulio Bessa).

## RESUMO

### DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UM SISTEMA MICROEMULSIONADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* Cheel

<sup>1</sup>Beatriz Patricio Rocha; <sup>2</sup>Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

<sup>1,2</sup> Universidade Estadual da Paraíba- UEPB

<sup>1</sup>beatrizpatricio@gmail.com

Lesões cutâneas podem resultar em um quadro infeccioso, havendo necessidade de tratamento com antimicrobianos. Com o crescente aumento da resistência microbiana, uma mudança de paradigma no tratamento de doenças infecciosas é necessária para evitar que os antibióticos se tornem obsoletos e o uso de produtos naturais é uma alternativa que deve ser considerada. O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel (OEM) possui propriedade antimicrobiana e é bastante incorporado como ingrediente ativo em formulações tópicas para o tratamento de lesões cutâneas. As microemulsões (ME) são sistemas capazes de compartimentar ativos de diferentes solubilidades, e assim possibilitam a incorporação de óleos essenciais, os direcionando para sítios de ação farmacológica e contornando pontos como solubilidade e volatilidade. Este trabalho teve como objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana de ME contendo OEM. As formulações foram obtidas a partir do desenvolvimento do diagrama de fases pseudoternário (DFPT) e caracterizadas pelas análises de aspecto macroscópico, pH, índice de refração (IR), condutividade e tamanho médio das gotículas (TMG). Também foram realizados testes de estabilidade preliminar, contemplando as análises de centrifugação, estresse térmico e ciclo resfriamento/aquecimento. Por último foi avaliado seu potencial antimicrobiano utilizando a técnica de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de cepas ATCC de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. O DFPT foi construído utilizando a mistura de tensoativos (Kolliphor<sup>®</sup> HS15 e Span<sup>®</sup> 80), na proporção de 9:1, como fase oleosa o miristato de isopropila e como fase aquosa a água destilada. A partir dele, foi selecionada uma formulação classificada visualmente como ME e incorporado o OEM na concentração de 5%. As formulações sem e com o óleo essencial (ME-BR e ME-OEM) apresentaram-se como sistemas límpidos e estáveis. Os valores encontrados de pH das formulações desenvolvidas foi em torno de 6,0 para as ME com e sem o OEM, o que indica compatibilidade para administração cutânea. Além disso, a condutividade de  $195,56 \pm 8,2 \mu\text{S}/\text{cm}$  e  $199,0 \pm 0,49 \mu\text{S}/\text{cm}$  e o índice de refração  $1,382 \pm 0,00$  e  $1,385 \pm 0,00$  para ME-BR e ME-OEM, respectivamente, sugerindo um sistema O/A. O TMG dos sistemas foi de  $24,96 \pm 0,10 \text{ nm}$  e  $24,58 \pm 0,41 \text{ nm}$  para ME-BR e ME-OEM, respectivamente, demonstrando ser de fato ME. As formulações apresentaram boa estabilidade diante dos testes de centrifugação e ciclo resfriamento/aquecimento. Foi verificado que a ME-OEM demonstrou ser eficaz *in vitro* contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans*, com CIM de 25 mg/mL; 12,5 mg/mL; 25 mg/mL e 1,56 mg/mL, respectivamente. Portanto, a ME-OEM como um sistema estável e adequado para uso tópico, pode oferecer uma nova alternativa ao tratamento de infecções cutâneas.

**Palavras-chave:** Diagrama de fases pseudoternário; Infecções cutâneas; Microemulsões; Produtos Naturais.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF ANTIMICROBIAN ACTIVITY OF A MICROEMULSIONED SYSTEM CONTAINING ESSENTIAL OIL OF *Melaleuca alternifolia* Cheel

<sup>1</sup> Beatriz Patricio Rocha; <sup>2</sup> Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno  
<sup>1,2</sup> State University of Paraíba - UEPB  
<sup>1</sup>beatrizpatricio@gmail.com

Skin lesions may result in an infectious condition, requiring antimicrobial treatment. With increasing microbial resistance, a paradigm shift in the treatment of infectious diseases is needed to prevent antibiotics from becoming obsolete and the use of natural products is an alternative that should be considered. *Melaleuca alternifolia* Cheel (OEM) essential oil has antimicrobial properties and is widely incorporated as an active ingredient in topical formulations for the treatment of skin lesions. Microemulsions (ME) are systems capable of compartmentalizing assets of different solubilities, thus enabling the incorporation of essential oils, directing them to pharmacological action sites and bypassing points such as solubility and volatility. This work aimed to develop, characterize and evaluate the antimicrobial activity of ME containing OEM. The formulations were obtained from the development of the pseudo-ternary phase diagram (DFPT) and characterized by the analysis of macroscopic aspect, pH, refractive index (IR), conductivity and average droplet size (TMG). Preliminary stability tests were also performed, including centrifugation, thermal stress and cooling/heating cycle analysis. Finally, their antimicrobial potential was evaluated using the microdilution technique to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of ATCC strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. The DFPT was constructed using a 9: 1 surfactant mixture (Kolliphor® HS15 and Span® 80) as the oily phase isopropyl myristate and the distilled water as aqueous phase. From it, a formulation visually classified as ME was selected and the OEM incorporated at a concentration of 5%. The formulations without and with the essential oil (ME-BR and ME-OEM) presented themselves as clear and stable systems. The pH values found in the formulations developed were around 6.0 for ME with and without OEM, which indicates compatibility for cutaneous administration. In addition, the conductivity of  $195.56 \pm 8.2 \mu\text{S}/\text{cm}$  and  $199.0 \pm 0.49 \mu\text{S}/\text{cm}$  and the refractive index  $1.382 \pm 0.00$  and  $1.385 \pm 0.00$  for ME-BR and ME-OEM respectively suggesting an O/A system. The GMT of the systems was  $24.96 \pm 0.10 \text{ nm}$  and  $24.58 \pm 0.41 \text{ nm}$  for ME-BR and ME-OEM, respectively, proving to be in fact ME. The formulations presented good stability in the centrifugation and cooling/heating cycle tests. ME-OEM was found to be effective in vitro against *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *C. albicans*, with MIC of 25 mg/mL; 12.5 mg/mL; 25 mg/mL and 1.56 mg/mL, respectively. Therefore, ME-OEM as a stable system suitable for topical use may offer a new alternative to treating skin infections.

**Keywords** Pseudoternary phase diagram; Skin infections; Microemulsions; Natural products.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fotografias de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel. ....	17
Figura 2 – Tipos de microemulsões esquematizadas quanto à fase dispersa e dispersante.....	23
Figura 3 – Esquema do efeito da temperatura (T) e da concentração de tensoativo no tipo de ME.....	24
Figura 4 – Modelo de um diagrama de fases de uma mistura ternária composta por água, óleo e tensoativo.....	26
Figura 5 – Diagrama de fases pseudoternário.....	34
Figura 6 – Aspecto macroscópico das formulações.....	36
Figura 7 – Formulações após centrifugação.....	39
Figura 8 – Formulações após estresse térmico.....	40
Figura 9 – Formulações após resfriamento/aquecimento.....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes majoritários do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel.....	19
Tabela 2 – Composição percentual (m/m) das formulações selecionadas.....	35
Tabela 3 – Caracterização físico química e morfológica: pH, condutividade elétrica e índice de refração, tamanho médio de gotículas.....	37
Tabela 4 – pH, condutividade elétrica e índice de refração, após ciclo resfriamento/aquecimento.....	41
Tabela 5 – Determinação da concentração inibitória mínima das cepas bacterianas testadas.....	42
Tabela 6 – Determinação da concentração inibitória mínima da cepa fúngica testada..	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O	Água em óleo
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DFPT	Diagrama de fases pseudoternário
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
ELL	Emulsão líquido leitosa
ELO	Emulsão líquido opaca
ESSO	Emulsão Semissólida Opaca
IR	Índice de refração
KHS15	Kolliphor <sup>®</sup> HS15
NSLF	Novos Sistemas de Liberação de Fármacos
ME	Microemulsão
ME-BR	Microemulsão branca
ME-OEM	Microemulsão com óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel
MIP	Miristato de isopropila
O/A	Óleo em água
OEM	Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel
ST	Sistema transparente
TMG	Tamanho médio das gotículas
LDCPF	Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
2.	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
2.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	14
2.2	<b>Objetivos Específicos</b> .....	14
3.	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
3.2	<b>Resistência Microbiana</b> .....	15
3.3	<b>O óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel</b> .....	16
3.4	<b>Nanotecnologia e novos sistemas de liberação de fármaco</b> .....	21
3.5	<b>Microemulsão</b> .....	22
4.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
4.1	<b>Material</b> .....	27
4.2	<b>Métodos</b> .....	27
4.2.1	Construção do diagrama de fases pseudoternário .....	27
4.2.2	Seleção das formulações .....	28
4.2.3	Caracterização físico-química e morfológica das formulações.....	28
4.2.3.1	<i>Análise macroscópica</i> .....	28
4.2.3.2	<i>Determinação do pH</i> .....	28
4.2.3.3	<i>Determinação da Condutividade Elétrica</i> .....	29
4.2.3.4	<i>Índice de Refração</i> .....	29
4.2.3.5	<i>Tamanho médio das gotículas</i> .....	29
4.2.4	Avaliação da estabilidade preliminar das formulações .....	29
4.2.4.1	<i>Teste de centrifugação</i> .....	29
4.2.4.2	<i>Estresse térmico</i> .....	30
4.2.4.3	<i>Ciclo resfriamento/aquecimento</i> .....	30
4.2.5	Análise microbiológica .....	30
5.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32
5.1	<b>Seleção dos componentes da formulação</b> .....	33
5.2	<b>Construção de diagramas de fases</b> .....	33
5.3	<b>Seleção das formulações</b> .....	34
5.4	<b>Caracterização físico-química e morfológica das formulações</b> .....	35
5.5	<b>Avaliação da estabilidade preliminar das formulações</b> .....	38
5.5.1	Teste de centrifugação .....	38
5.5.2	Estresse térmico.....	39
5.5.3	Ciclo resfriamento/aquecimento.....	40
5.6	<b>Avaliação da atividade antimicrobiana</b> .....	41
6.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	45
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	46

## 1. INTRODUÇÃO

A pele atua como barreira física, imunológica e microbiana muito eficaz na proteção do corpo contra desidratação e injúrias ambientais constantes. Rupturas na barreira da pele podem resultar em feridas e infecções, que são secundárias a incisões cirúrgicas, queimaduras, injúrias, abrasões, lacerações dentre outras causas (LACERDA, 2018; TORRES et al., 2017).

Os tecidos cutâneos expostos garantem ambiente propício para a proliferação bacteriana. A presença de bactérias nas feridas, provoca uma série de respostas locais e sistêmicas no hospedeiro que conduzem a um retardo na cicatrização, o que resulta em maior exposição à contaminação por diferentes espécies bacterianas. Entre estas, estão as produtoras de toxinas que podem estimular a produção de mediadores inflamatórios locais, potencializando a proliferação bacteriana de várias outras espécies, e como um agravante: redução da efetividade na terapia antimicrobiana (COHEN et al., 2016; RUDKIN et al., 2017).

Diversas doenças microbianas de origem bacteriana ou fúngica são relatadas na literatura. O tratamento dessas infecções é realizado através do uso de fármacos antimicrobianos. Em muitos casos, os responsáveis pelas infecções adquirem resistência ao medicamento quando o agente antimicrobiano não é capaz de inibir o crescimento do microrganismo ou matá-lo (SERRA et al., 2018). Paralelamente, a busca de novos fármacos ou aperfeiçoamento de antimicrobianos de origem natural que apresentem atividade sobre grande espectro de microrganismos e que possam ser usados como alternativa aos antibióticos convencionais tem despertado o interesse da classe científica como uma das formas de evitar o surgimento de novos mecanismos de resistência e de combate aos já existentes (PERRICONE et al., 2015).

Com isso, as plantas medicinais estão sendo amplamente empregadas para o tratamento de diversas doenças. A *Melaleuca alternifolia* Cheel é uma espécie rica em óleos essencial, e nos últimos anos é amplamente utilizada na produção de formas farmacêuticas, devido a suas inúmeras atividades, destacando-se a sua ação antimicrobiana contra patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Desse modo, possui a capacidade de fornecer uma alternativa barata para o tratamento de infecções cutâneas seja como agente único ou na forma associado a outros medicamentos (ASSIS, 2017; RAMADAN et al., 2019).

Além disso, a busca por alternativas terapêuticas que minimize reações adversas e que reduza as altas doses diárias de fármacos tem levado ao desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos (NSLF), pois consiste em métodos e formulações tecnológicas capazes de retardar, prolongar, controlar ou redirecionar a liberação em sítios específicos de um insumo farmacêutico ativo, melhorando o índice terapêutico e aumentando a adesão do paciente a farmacoterapia (ROBERTS et al., 2017; NASTITI et al., 2017).

Como um desses NSLF, as microemulsões (ME) emergiram como um poderoso transportador de fármacos devido às suas propriedades únicas. Elas são dispersões opticamente isotrópicas, transparentes e termodinamicamente estáveis, que possuem pequenas gotículas e baixa tensão interfacial, o que pode resultar em permeação aprimorada, alta absorção de fármacos e, conseqüentemente, melhor biodisponibilidade. (NEVES et al., 2018; REIS et al., 2017).

Atualmente, o desenvolvimento de ME utilizando óleos vegetais têm sido eficiente em aplicações tópicas, por melhor aproveitar as atividades benéficas devido a composição química presentes nesses óleos (YADAV et al., 2017). Neste contexto, a incorporação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel (OEM) em um sistema microemulsionado para o tratamento de infecções cutâneas é favorável, pois visa superar alguns pontos negativos da terapêutica convencional.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar físico-quimicamente e avaliar a atividade antimicrobiana de ME contendo OEM para administração tópica.

### 2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste projeto foram:

- a) desenvolver e utilizar um diagrama de fases pseudoternário (DFPT) para obtenção de possíveis regiões de formação de sistemas opticamente transparentes;
- b) selecionar ponto do DFPT da região opticamente transparente para incorporar o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel;
- c) caracterizar físico-quimicamente e morfológicamente os sistemas obtidos, contemplando as análises de: aspecto macroscópico, pH, condutividade elétrica, índice de refração e tamanho médio das gotículas;
- d) avaliar a estabilidade preliminar dos sistemas obtidos, através dos ensaios de centrifugação, ciclo de resfriamento/aquecimento e estresse térmico;
- e) avaliar a atividade antimicrobiana dos sistemas utilizando a técnica de microdiluição.

### **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1 Infecções Cutâneas**

Feridas cutâneas são rupturas da estrutura e função anatômica normal da pele e resultam de processos patológicos. A quebra da integridade da pele pode resultar em feridas classificadas de diversas maneiras. De acordo com o tempo de cicatrização, as feridas cutâneas podem ser classificadas em agudas ou crônicas. Tais feridas podem ser superficiais, envolvendo tanto a epiderme como a camada superficial da derme, ou até a espessura total da pele, onde a camada subcutânea é comprometida. Lesões deste tipo são, geralmente, ocasionadas por incisões cirúrgicas, queimaduras, abrasões ou lacerações, alterações vasculares, defeitos metabólicos e neoplasias (ZHANG et al., 2017).

A perda da integridade cutânea proporciona um ambiente propício para desenvolvimento de microrganismos. Estes podem ser resultantes do próprio hospedeiro ou adquiridos do meio ambiente. A infecção ocorre decorrente do desequilíbrio entre o sistema imunológico do hospedeiro, as condições no interior da ferida e bactérias, resultando na proliferação bacteriana. Os microrganismos que invadem a ferida e causam danos são em especial, bactérias, mas também fungos e vírus. Entre as bactérias mais frequentes em feridas estão *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e estreptococos beta-hemolítico (ASSIS, 2017).

Além de estar relacionada com a resposta imune do hospedeiro, a variedade de agentes microbianos envolvidos na etiologia da infecção da ferida é influenciada pela sua localização no corpo, pela profundidade dos tecidos afetados e pela qualidade e intensidade da perfusão tecidual. Adicionalmente, embora muitas vezes seja necessário o emprego de antimicrobianos, estes, podem remover microrganismos comensais importantes, como é o caso do *S. epidermidis*, permitindo que organismos potencialmente patogênicos colonizem a ferida mais efetivamente (LACERDA, 2018).

#### **3.2 Resistência Microbiana**

Um desafio global emergente bem reconhecido é a disseminação de bactérias resistentes a múltiplas drogas, isto devido à alta taxa de mortalidade e a falta de opções terapêuticas ativas (VENTOLA, 2015). A escassez de opções terapêuticas é dada pela falta de investimentos da indústria farmacêutica, uma vez que o custo elevado para a produção de um novo antimicrobiano é o mesmo para produção de outros medicamentos de classes

mais lucrativas, como antineoplásicos e medicamentos para tratamento de doenças crônicas (BLASKOVICH; BUTLER; COOPER, 2017).

Segundo Sousa (2013) o desenvolvimento de mecanismos de resistência dos microrganismos ocorre através do processo de seleção natural; quando uma população de cepas é exposta a um determinado antibiótico, aquelas que possuem mecanismos adaptativos conseguem sobreviver às ações do fármaco e aqueles que são susceptíveis morrem. Entre as bactérias frequentemente associadas ao desenvolvimento de multirresistentes estão: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosas* e *Klebsiella pneumoniae* (HOLMES et al., 2015).

O uso indiscriminado dos fármacos antimicrobianos, como a automedicação, prescrição inadequada, uso abusivo e o uso de maneira off label, é ainda um agravante para o surgimento de cepas multirresistentes que tem como consequência o aumento da mortalidade e a elevação dos custos de tratamento e internação (SAMPAIO; SANCHO; LAGO, 2018).

Com relação à resistência fúngica, o desenvolvimento de resistência em *Candida* spp., a partir da terapia com anfotericina B, contra drogas do grupo azol, equinocandina e fluconazol tem causado preocupação, com relatos de casos de multirresistência de diferentes regiões do mundo, como Ásia e Oriente Médio e algumas áreas da América do Sul. Esses dados são alarmantes porque essa resistência se desenvolveu contra medicamentos antifúngicos amplamente utilizados no combate a doenças fúngicas em todo o mundo (FELIPE et al., 2018).

Para Perricone et al. (2015) alternativas como substâncias naturais são propostas interessantes para enfrentar o problema de cepas multirresistentes. Os produtos naturais são amplamente utilizados na sociedade e entre as suas propriedades medicinais, encontram-se além da antibacteriana, propriedades antifúngicas, antiespasmódicas, anti-inflamatórias, antimutagênicas e antivirais (MARTINS et al., 2015).

### **3.3 O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel**

Há um crescente interesse em estudar compostos isolados de extratos de plantas e, em particular, de óleos essenciais (OE), decorrente de seu potencial uso multifuncional. Geralmente seus ingredientes ativos são terpenos, metabólitos secundários excretados para expulsar predadores ou agentes nocivos (KASKATEPE et al., 2016).

Documentado como sendo usado na comunidade há mais de 90 anos, o OEM tem sido usada na medicina popular aprendida com aborígenes ao norte de Nova Gales do Sul na Austrália. As folhas eram maceradas em água por períodos longos e depois empregadas para o tratamento de dor de garganta, resfriado, feridas ou infecções fúngicas da pele e picadas de insetos (ZHANG et al., 2018).

Tradicionalmente, o OEM conhecido como óleo da árvore do chá, é uma mistura complexa de aproximadamente 100 compostos, produzida pela planta australiana homônima, que apresenta inúmeras aplicações em virtude das suas propriedades medicinais e aromáticas, sendo amplamente utilizadas em formulações farmacêuticas e cosméticas, atuando também como conservante natural. Tais atividades associam-se à riqueza de mono e sesquiterpenos (HOMEYER et al., 2015).

Pertence a família *Myrtaceae* que se subdivide em duas subfamílias: *Myrtoideae* de ampla ocorrência na América Tropical, e *Leptospermoideae*, encontrada principalmente na Austrália, Polinésia e Malásia. O gênero *Melaleuca* pertence a esta última subfamília, inclui cerca de 100 espécies nativas da Austrália e das ilhas do oceano Índico, apesar de serem encontradas diversas espécies de *Melaleuca*, a nomenclatura tea tree oil, diz respeito apenas, à espécie *Melaleuca alternifolia* Cheel, oficialmente reconhecida pelo Australian Therapeutic Goods Administration (MIRANTE, 2015; OLIVEIRA, 2015).

A planta apresenta uma casca fina e folhas pontiagudas e longas que, quando partidas, exalam um aroma forte. Em geral florescem próximas de rios e em áreas de pântano, podendo atingir cerca de sete metros de altura, sendo cortada após 5 meses do cultivo e recortadas a cada ano, devido ao seu rápido crescimento (ANDRADE et al., 2018). Na Figura 1, estão representados arbustos de *Melaleuca alternifolia* Cheel, folhas e flores.

Figura 1 - Fotografias de *Melaleuca alternifolia* Cheel.



Legenda: planta inteira (A), destaque para as flores (B).

Fonte: ANDRADE et al., 2018

O OEM foi obtido pela primeira vez em 1925 por Arthur Penfold, curador do Museu Australiano de Artes e Ciências Aplicadas, que o destilou e avaliou suas propriedades antimicrobiana com ampla ação antifúngica e bacteriana (MIRANDA, 2014).

Quando começou a grande procura pela planta durante a Segunda Guerra Mundial, o OEM foi utilizado em grandes quantidades como agente antisséptico. A princípio, para o tratamento de doenças nos pés e na assepsia de feridas, para isso suas folhas eram esmagadas e colocadas diretamente no local da lesão. Nos últimos anos, transpôs barreiras chegando a Europa e América do Norte, onde é comercializado para o tratamento de várias doenças (SOUZA et al., 2018).

Desde a sua introdução na década de 1920, a resistência ao OEM ainda não foi relatada. É provável que sua natureza multicomponente possa reduzir o potencial de resistência ocorrer espontaneamente, uma vez que múltiplas mutações simultâneas seriam necessárias para superar todas as ações dos componentes individuais. Além disso, como é conhecido que o OEM presumivelmente afeta múltiplas propriedades e funções associadas à membrana celular, semelhante ao caso dos biocidas ativos na membrana. Isso significa que vários alvos teriam que se modificar para superar os efeitos do óleo (CUNHA, 2019; TURCHI et al., 2018).

### 3.3.1 Composição fitoquímica

A composição do OEM, resumida por monoterpenos, sesquiterpenos e seus álcoois correspondentes, é regulada pelo padrão internacional (ISO 4730), que descreve as concentrações mínimas e máximas dos seus componentes majoritários (BACOLLI et al., 2015; LAHKAR; DAS; BORA, 2013). Como está descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Componentes majoritários do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel.

Componente	Composição (%)	
	ISO 4730 <sup>a</sup>	Composição típica
Terpinen-4ol	=30 <sup>b</sup>	40,1
$\gamma$ -Terpineno	10-28	23,0
$\alpha$ -Terpinen	5-13	10,4
1,8-Cineole	=15 <sup>c</sup>	5,1
Terpinoleno	1,5-5	3,1
p-Cymene	0,5-12	2,9
$\alpha$ -Pinene	1,6	2,6
$\alpha$ -Terpineol	1,5-8	2,4
Aromadendrene	Mínimo-7	1,5
$\delta$ -Cadinene	Mínimo-8	1,3
Limoneno	0,5-4	1,0
Sabineno	Mínimo-3,5	0,2
Globulol	Mínimo-3	0,2
Viridiflorol	Mínimo-1,5	0,1

Fonte: adaptado de Mertas et al., 2015.

Legenda: <sup>a</sup>ISO 4730, Organização internacional para padronização. <sup>b</sup>Nenhum limite superior está definido. <sup>c</sup>Nenhum limite inferior está definido.

Em relação aos seus compostos químicos, os componentes que participam do padrão internacional foram escolhidos devido a sua composição química e sua atividade biológica, sendo os principais constituintes o terpinen-4-ol, seguido do  $\gamma$ -terpineno e  $\alpha$ -terpineno, responsáveis pelo seu vasto espectro de atividade antisséptica, anti-inflamatória, antiviral e antibacteriana (MIRANTE, 2015).

O Terpinen-4-ol está presente em 30-40% da composição, sendo o componente que detêm a principal atividade antimicrobiana, pois induz perda da membrana, interferindo na integridade e fisiologia bacteriana (FELIPE et al., 2018).

### 3.3.2 Atividade farmacológica

O OEM tem uma longa história como antisséptico de uso tópico. Recentemente ganhou uma reputação como antisséptico seguro, eficaz e natural. Isso gerou um ressurgimento de sua popularidade e atualmente é incorporado como antimicrobiano principal ou como conservante natural em produtos farmacêuticos e cosméticos de uso externo (ANDRADE et al., 2018).

Além disso, o óleo reduz a taxa de reprodução de patógenos, e intensifica a resistência contra esses agentes agressores, por esse motivo é útil nas afecções do couro cabeludo, como a caspa, e de pele, como a acne grau I e grau II. Apresenta amplo espectro em atividades antiviral e antiprotozoária, neste caso frente a *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* e *Trichomonas vaginalis* (BRUN et al., 2019; PIRES, 2019).

Possui incrível capacidade bactericida tanto nas espécies Gram-positivas quanto nas Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* sensível à *meticilina*, cepas clínicas de *S. aureus* resistente à *meticilina*, *K. pneumoniae* resistente a carbapenem, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, o OEM vaporizado pode inibir bactérias, incluindo *Mycobacterium avium*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae* (ELMI et al., 2019; PIRES, 2019; OLIVA et al., 2018).

Apresenta atividade antifúngica potente contra variedade de leveduras, dermatófitos e outros fungos filamentosos suscetíveis a sua ação como *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Epidermophyton floccosum*, *Cladosporium spp.* e *Candida spp.* Sendo considerada uma alternativa promissora no tratamento de estomatites causadas por dentaduras, podendo ser usado para revestir dentaduras e reduzir as feridas causadas por *Candida*, sendo também usado no tratamento de candidíase vulvovaginal. Pesquisas *in vivo* demonstraram que o OEM quando aplicado em nanoemulsões demonstra efeito antifúngico mais satisfatório do que os fármacos utilizados convencionalmente (FELIX; RÖDER; PEDROSO, 2018; MIAO et al., 2016; PACHAVA et al., 2015).

O uso local contra acne vulgar foi mencionado na medicina tradicional tailandesa. O uso de um gel para acne com OEM a 5% demonstrou menos efeitos colaterais quando comparada ao uso de loção com peróxido de benzoíla a 5%. O efeito do peróxido de benzoíla não é tão intenso e duradouro como o OEM e causa maior intolerância ao produto (ANDRADE et al., 2018).

Com outras ações, também reduziria a inflamação local talvez por diminuir a liberação de histaminas. As propriedades antiinflamatórias contribuem com a cura de feridas crônicas e são baseadas na supressão da produção de mediadores inflamatórios pela ativação dos monócitos. Em estudo *in vitro* o OEM se mostrou indutor de apoptose em linhagem de células cancerígenas, sendo indicado seu uso em fórmulas farmacêuticas de uso tópico contra melanomas e cancro em células escamosas da pele (RAMADAN et al., 2019; ASSIS, 2017)

### **3.4 Nanotecnologia e novos sistemas de liberação de fármaco**

As formas farmacêuticas convencionais são necessariamente utilizadas em doses diárias repetidas para manutenção da concentração plasmática do fármaco na faixa terapêutica, o que conseqüentemente diminui a adesão mesmo sendo uma tecnologia de fácil acesso, além de aumentar as chances de reações adversas e limitar seu uso no tratamento de doenças crônicas (GUIMARÃES, 2013).

Para Jain, Mehra e Jain (2015) existe diversas limitações dos fármacos veiculados em sistemas convencionais, como a solubilidade em meio aquoso, toxicidade e biodisponibilidade podem ser corrigidas utilizando-se estratégias que melhorem as propriedades biofarmacêuticas e modifiquem a liberação do fármaco, com ganho na especificidade direcionando-o para os seus sítios de ação.

A nanotecnologia nos últimos anos tem gerado um grande impacto em várias áreas de pesquisa com o aumento do desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos baseados em nanocarreadores ganhando destaque principalmente por sua versatilidade, uma vez que existe uma infinidade de áreas onde possa oferecer contribuições significativas como seus potenciais usos na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças (ZHANG et al., 2016).

Os materiais e dispositivos desenvolvidos ao nível nanométrico pode interagir com as células e tecidos a um nível molecular com elevado grau de especificidade de integração aumentando a eficácia terapêutica e reduzindo a toxicidade dos fármacos, por diminuição da incidência de efeitos adversos permitindo assim a interação entre tecnologia e sistemas biológicos nunca antes atingível (DING; LI, 2017).

De acordo com Leite (2017) entre os principais nanosistemas de carreamento e liberação de fármacos estão as microemulsão, nanoemulsão, lipossomas, micelas, nanocristais e nanopartículas. Com relação a microemulsão (ME), pesquisas examinaram a

caracterização, formação e aplicação destes sistemas pelo seu vasto campo de uso como na fabricação de medicamentos e cosméticos, tecnologia de alimentos, preparação de nanomateriais e ciência ambiental (RASHID et al., 2019).

### 3.5 Microemulsão

O conceito de ME foi introduzido por volta de 1940, a partir da titulação de uma emulsão com hexanol, sendo descrita por Hoar & Schulman como uma solução transparente e translúcida. Diferentemente das emulsões, as ME são sistemas de baixa viscosidade, geralmente constituídos de água e altas concentrações de óleo, estabilizados por agente tensoativo podendo ser associado algumas vezes por um co-surfactante adicional, apresentam uma baixa tensão interfacial, combinada com uma área interfacial alta entre os fluidos não miscíveis (CALLENDER et al., 2017).

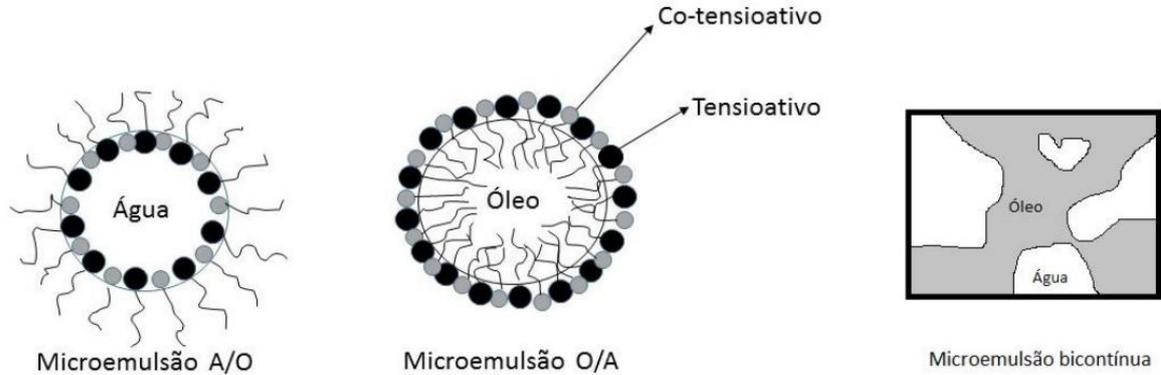
As ME possuem sua principal aplicação nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos. No campo farmacêutico como carreador de fármacos atuam incrementando a solubilização, dissolução e biodisponibilidade de fármacos, permitindo também uma liberação prolongada de fármacos pela via oral, parenteral, pulmonar, ocular, tópica e vaginal. Essa elevada taxa de difusão pode ser justificada pelo tamanho das gotículas, aproximadamente 100 vezes menor que as de uma emulsão tornando assim, o sistema isotrópico porque possui um diâmetro médio menor que  $\frac{1}{4}$  de luz incidente ( SHUKLA et al., 2018; DAMASCENO et al., 2011).

Estes sistemas únicos atraíram atenção nas últimas décadas devido à sua alta estabilidade termodinâmica. São um excelente veículo de membrana líquida para o transporte tanto para substâncias hidrofílicas como hidrofóbicas, possuindo uma alta capacidade de solubilização o que proporciona melhor biodisponibilidade, sendo também um sistema protetor para as moléculas do fármaco contra oxidação e hidrólise enzimática (RASHID et al., 2019; KAUR; MEHTA, 2017).

As ME podem ser classificada em três tipos: água em óleo (A/O) apresenta gotículas de água recobertas pelo tensoativo dispersas em uma fase oleosa contínua; óleo em água (O/A) apresenta a fase aquosa contínua com gotículas de óleo dispersas, as quais estão recobertas pelo tensoativo; bicontínua, neste caso os componentes hidrofílicos e hidrofóbicos formam uma estrutura bicontínua, com uma rede de tubos aquosos em matriz oleosa e uma rede de tubos em matriz aquosa ela é formada quando as micelas, conhecidas

como microrreatores, se colidem, se fundem e são separadas de forma periódica (XIAO et al., 2019). As formas estão representadas na Figura 2.

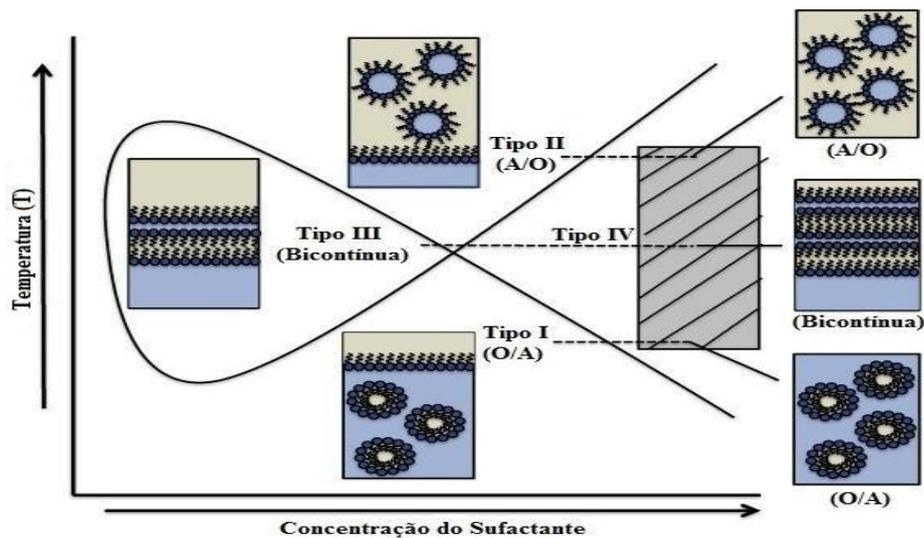
Figura 2 - Tipos de microemulsões esquematizadas quanto à fase dispersa e dispersante.



Fonte: PRETO, 2016.

Existem diversos fatores que podem determinar qual o tipo de ME será formado, como por exemplo aumento ou diminuição da concentração do tensoativo, ou até mesmo a mudança do tensoativo, cotensioativo e óleo, a razão entre água e óleo, a presença de íons na fase aquosa e a temperatura (CALLENDER et al., 2017). As ME seguem a tendência do diagrama de peixes representado na Figura 3.

Figura 3 – Esquema do efeito da temperatura (T) e da concentração de tensoativo no tipo de ME.



Fonte: LEITE, 2017.

Legenda: as estruturas esféricas representam a fase de ME contendo micelas, as regiões amarelas representam o óleo e as regiões azuis representam a água.

A água é comumente utilizada em sistemas estabilizados com tensoativos. Considerada um solvente anfiprótico neutro estruturado, caracteriza pela ligação de hidrogênio, mantendo a estrutura cristalina do estado sólido a distâncias da ordem de grandeza molecular, nesta fase aquosa pode conter aditivos, como tampões, bactericidas, e agentes isotônicos (SILVA et al., 2015).

A formação de ME é influenciada pelo tamanho das moléculas de óleo e a sua polaridade, pois as moléculas da fase oleosa devem estar em associação para penetrar no filme interfacial do tensoativo e o seu tamanho não deve ser muito grande ou pelo menos conter ligações insaturadas para facilitar a interação da fase oleosa com filme interfacial do tensoativo (POOMANEE et al., 2017).

A escolha do tensoativo é importante para determinar o tipo de emulsão, como dito anteriormente, por isso a necessidade de se conhecer suas características, analisando bem suas propriedades. Segundo Silva et al. (2015) os tensoativos ou surfactantes são substâncias caracterizadas pela presença em suas estruturas moleculares de duas regiões, uma apolar e hidrofóbica e outra polar e hidrofílica possibilitando a interação entre meios que apresentam polaridades diferentes a exemplo do óleo e água, atuam por reduzir a tensão interfacial na mistura, formando um filme interfacial fluido. Caso necessário, em ME utiliza-se co-tensoativo que aumentam a flexibilidade do sistema, proporcionando a redução máxima do tamanho das gotículas da fase interna, ampliando desta forma às regiões de ME (REYES; OLIVERA, 2018).

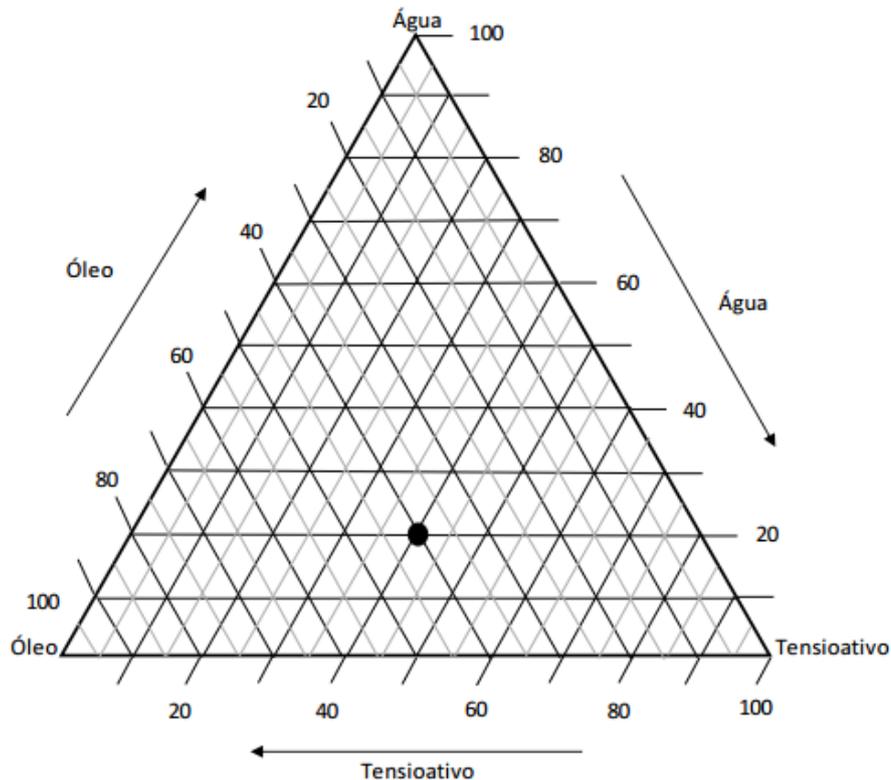
### 3.5.1 Diagrama de fases

O diagrama de fases (Figura 4) descreve em que condições experimentais se obtêm ME e as regiões que limitam a transição entre emulsões, gel, fases separadas e emulsões A/O ou O/A, estas regiões são escolhidas de acordo com características, como composição e viscosidade, adequadas para uma melhor incorporação do fármaco (PINEROS et al., 2017)

A representação de um sistema microemulsionado pode ser feita através de diagramas de fases pseudoternário (DFPT). Estes apresentam a forma de um triângulo equilátero, onde cada vértice representa um componente da ME, assumindo que são

sistemas formados por três componentes: fase aquosa, fases lipofílicas e tensoativo ou mistura de tensoativos/co-tensoativos, em concentrações que variam de 0 a 100% para cada componente (SILVA et al., 2015).

Figura 4 - Modelo de um diagrama de fases de uma mistura ternária composta por água, óleo e tensoativo.



Fonte: PRETO, 2016.

Os DFPT são geralmente construídos a partir de dados obtidos por titulação ou pela preparação de um amplo número de amostras de diferentes composições. A vantagem do método de titulação é que ele pode ser usado para estudar um amplo número de amostras de diferentes composições de forma mais rápida. (GUIMARÃES, 2013).

Os sistemas obtidos no DFPT são diferenciados visualmente e pode-se obter a fórmula global do sistema no momento em que se atingem as características necessárias para obtenção da ME. A análise detalhada dos diagramas de fases mostra que a mistura dos componentes das ME, em diferentes concentrações, pode gerar vários tipos de agregados nos limites desses diagramas. São construídos diagramas de fases pseudoternários para

localizar as diferentes zonas, incluindo a de formação das ME devido à dificuldade de interpretar o diagrama de fases quaternário (ASSIS, 2017; OLIVEIRA, 2015).

No DFPT são visualizadas emulsões líquido opacas, emulsões géis opacos, sistemas de viscosidade elevada, separação de fases, e sistemas translúcidos ou opticamente transparente. Este último é característico de ser um sistema microemulsionado (PRETO, 2016).

As propriedades dos triângulos equiláteros devem ser extremamente exploradas, ou seja, a soma dos lados perpendiculares de um determinado ponto no triângulo é igual a sua altura. A Figura 4 representa a estrutura do diagrama ternário, representado pela mistura da fase oleosa, fase aquosa e tensoativo. O ponto destacado do trabalho de Preto (2015) representa uma formulação com 40% da fase oleosa, 20% da fase aquosa e 40% de tensoativo.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

Os materiais utilizados para o estudo foram:

- a) óleo essencial de *Melaleuca alternifolia.*, By Samia<sup>®</sup>, Brasil;
- b) miristato de isopropila, Fragon, Brasil;
- c) Kolliphor<sup>®</sup> HS 15, Sigma Aldrich, USA;
- d) Span<sup>®</sup> 80, Sigma Aldrich, USA;
- e) água destilada, Destilador de água Pilsen, modelo SP5L, Brasil;
- f) ágar Muller Hinton, Himedia<sup>®</sup>, Brasil;
- g) ágar Sabouraud, BD<sup>®</sup>, Brasil;
- h) microplaca 96 cavidades, Global Plast, China.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Construção do diagrama de fases pseudoternário

A fim de encontrar as concentrações dos componentes favoráveis para o desenvolvimento de ME, foi construído diagrama de fases pseudoternário (DFPT) através da mistura dos componentes: água destilada (fase aquosa), miristato de isopropila (MIP – fase oleosa) e Kolliphor<sup>®</sup> HS 15/Span<sup>®</sup> 80 (tensoativos). A proporção de 9:1 para os tensoativos foi definida após a realização dos cálculos de EHL (Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo) a fim de assemelhar o valor de EHL da mistura de tensoativos em função do valor de EHL do MIP, baseados na Equação 1:

$$EHL_{mistura\ tensoativos} = \frac{\%p_{Kolliphor^{\circledR} HS15} \times EHL_{Kolliphor^{\circledR} HS15} + \%p_{Span^{\circledR} 80} \times EHL_{Span^{\circledR} 80}}{100} \quad (1)$$

À mistura de tensoativos foi adicionada quantidades de MIP com o intuito de resultar nas seguintes proporções: 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1, respectivamente. Em seguida foi adicionada a água destilada em volumes pré-definidos pelo o método de titulação. Após cada adição da fase aquosa, o produto final foi submetido a 2 ciclos de agitação em um sonicador (Desruptor Ultrasônico – Unique<sup>®</sup> DES 500, Brasil), por 3 min em potência de 250 W e levada ao banho de ultrassom (Lavadora Ultrassônica – Unique<sup>®</sup> USC 2800A, Brasil), para retirada do excesso de bolhas de ar incorporadas ao sistema, por

um período de 3 min à temperatura ambiente (CAVALCANTI et al., 2016). Depois desse processo, foi realizada a classificação visual dos sistemas obtidos em: emulsão líquido leitosa (ELL), emulsão líquido opaco (ELO), sistema transparente (ST) e emulsão semissólida opaca (ESSO). Os resultados da classificação dos sistemas foram plotados usando o Software Origin<sup>®</sup> Pro 8 para obtenção do modelo gráfico do diagrama.

#### 4.2.2 Seleção das formulações

Posteriormente a construção do DFPT, foi selecionado um ponto da região ST, que é característico da região de formação de ME e assim foi definida as proporções de cada componente a ser utilizado na formulação. O OEM na concentração de 5% foi adicionado a mistura de tensoativos e óleo e seguiu-se o mesmo procedimento utilizado para a produção do diagrama de fases pseudoternário. A mistura foi levada ao banho-maria e, posteriormente, foi realizado dois ciclos no sonificador e banho de ultrassom para remoção do excesso de bolhas (ASSIS, 2017).

#### 4.2.3 Caracterização físico-química e morfológica das formulações

##### 4.2.3.1 *Análise macroscópica*

As formulações foram preparadas e deixadas em repouso à temperatura ambiente e, após 48h, foi verificada as características organolépticas, homogeneidade da formulação, separação de fases ou presença de precipitado. A análise foi feita em triplicata no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) da UEPB (CAVALCANTI et al., 2016).

##### 4.2.3.2 *Determinação do pH*

Para determinação do pH das formulações escolhidas foi utilizado um pHmetro digital (MS TECNOPON Instrumentação mPA210, Brasil) calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, à temperatura de  $25 \pm 0,5$  °C. As análises foram realizadas em triplicata introduzindo o eletrodo no interior das amostras no Laboratório de Controle Físico-Químico da Farmácia Escola da UEPB (NEVES et al., 2018; SINDHU et al., 2018; DEHGhani et al., 2017).

#### 4.2.3.3 Determinação da Condutividade Elétrica

A condutividade elétrica das formulações foi determinada utilizando-se um condutivímetro digital (MS TECNOPON Instrumentação, mCA 150, Brasil), calibrado com solução de calibração apresentando condutância específica de 141,3  $\mu\text{S}/\text{cm}$  à temperatura de  $25 \pm 0,5$  °C. O eletrodo foi introduzido diretamente em 10 ml da formulação. As análises foram realizadas em triplicata no Laboratório de Controle Físico-Químico da Farmácia Escola da UEPB (POH et al., 2019).

#### 4.2.3.4 Índice de Refração

O índice de refração (IR) foi determinado utilizando refratômetro de bancada tipo Abbé. As análises foram realizadas em triplicata e o equipamento foi aferido com água destilada (IR= 1,3325) à temperatura de  $25 \pm 0,5$  °C. As análises foram realizadas em triplicata no Laboratório do departamento de Química da UEPB (NEVES et al., 2018).

#### 4.2.3.5 Tamanho médio das gotículas

O tamanho médio das gotículas foi determinado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), através do equipamento Nanotrack Wave (Model MN40, EUA). As medições foram realizadas com um ângulo de dispersão de 90° em temperatura constante de 25°C, em triplicata, no LDCPF da UEPB (NEVES et al., 2018; POOMANEE et al., 2017; CAVALCANTI et al., 2016).

### 4.2.4 Avaliação da estabilidade preliminar das formulações

#### 4.2.4.1 Teste de centrifugação

Para centrifugação retirou-se uma alíquota de 1,0 mL das formulações e adicionou-se em um microtubo do tipo *Eppendorf* e submete-se à centrifugação em microcentrífuga (Centrífuga Hettich – MIKRO 220 R, Alemanha) com ciclos de 13000 rpm (22760 g) por 30 e 60 min. A análise foi realizada em triplicata no LDCPF da UEPB (TAO et al., 2018; MOURI et al., 2016).

#### 4.2.4.2 Estresse térmico

As amostras do estresse térmico foram submetidas a temperaturas na faixa de 40 a 80 °C, com progressão da elevação da temperatura de 5 °C a cada 30 min em banho-maria (SOLAB SL155/10, Brasil). A presença de separação de fases ou qualquer outra evidência de instabilidade nas amostras analisadas foi avaliada ao final do experimento e após retornar à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C). Essa análise foi realizada no LDCPF da UEPB (GALVÃO, 2015).

#### 4.2.4.3 Ciclo resfriamento/aquecimento

As amostras analisadas foram submetidas a 6 ciclos, em que cada ciclo corresponde ao período de 24 h a temperatura de  $5,0 \pm 2,0$  °C na geladeira, seguido por 24 h na temperatura de  $40,0 \pm 2,0$  °C na estufa, totalizando-se 12 dias de análise. As amostras foram analisadas antes do teste e ao fim de cada ciclo avaliando as características físico-química e morfológica das formulações: condutividade elétrica, índice de refração e pH. A análise foi feita em triplicata no LDCPF da UEPB (LEITE, 2017; TAO et al., 2017).

#### 4.2.5 Análise microbiológica

##### 4.2.5.1 Avaliação da atividade antibacteriana e determinação da Concentração Inibitória Mínima

Para a avaliação da atividade antibacteriana foram selecionadas cepas bacterianas padrão ATCC de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25922) e *Escherichia coli* (ATCC 27853), obtidas do Laboratório de Microbiologia da UEPB. Os inóculos foram preparados em solução salina estéril (0,85%) de acordo com a escala de McFarlad 0,5 em comprimento de onda de 530 nm, fornecendo uma suspensão-padrão de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  UFC/ mL.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada de acordo com os documentos M272A2 e M27S3 do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), com adaptações. Inicialmente foi realizada a reativação das cepas, em que foram adicionadas 100 µL de caldo Muller Hinton no orifício das placas de microdiluição com 96 poços dispostos em 12 colunas e 8 linhas. Em cada placa foi feita a análise de um microrganismo. As três primeiras linhas das placas foram destinadas à análise da formulação, a quarta linha a ME sem OEM para verificar se os tensoativos e o MIP que

compõem a ME apresentam atividade antimicrobiana. Desse modo foi adicionado 100 µL das formulações. E em seguida, foi feita a diluição seriada partindo-se da primeira coluna (concentração inicial/100%) sendo retirado 100 µL do poço anterior para o posterior, até completar a última coluna, sendo descartados os 100 µL da última linha. (NEVES et al., 2018).

As microplacas foram incubadas por um período de 24 h em estufa a 37 °C. Ao final desse tempo foi adicionado o corante resazurina e incubadas por mais de 4 h para visualização dos resultados.

#### *4.2.5.2 Avaliação da atividade antifúngica e determinação da concentração inibitória mínima*

Para a avaliação da atividade antifúngica foi selecionada uma cepa de *Candida albicans* (ATCC 10231) obtida do laboratório de Microbiologia da UEPB. Os inóculos foram preparados em solução salina estéril (85%). A padronização da suspensão foi feita exatamente como descrita para atividade antibacteriana. Para realização do teste de microdiluição foi utilizado a mesma técnica desenvolvida para avaliar a atividade antibacteriana, no entanto foi utilizado caldo Sabouraud, como meio de cultura.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Seleção dos componentes da formulação

As características e aplicações dos componentes que são selecionados para formar a ME é de grande importância no desenvolvimento de formulações. Portanto, os parâmetros de EHL e a capacidade de irritação na pele foram adotados como critérios na seleção dos componentes. Como fase oleosa foi selecionado o MIP, éster do ácido mirístico, um ácido graxo essencial derivado do óleo de palmiste e álcool isopropílico. De acordo com Zhang et al. (2017), o MIP possui EHL 11,5, é biocompatível, não tóxico e amplamente utilizado em formulações de ME, principalmente para administração por via tópica e transdérmica por intensificar o efeito de permeabilidade dos fármacos utilizados nas formulações. É baseado no seu EHL que se pode então direcionar a procura do sistema de tensoativos ideais para estabilizar formulações (SHUKLA et al., 2018).

A escolha do tipo de tensoativo e principalmente da concentração deste na formulação não se baseia apenas no perfil de permeação ou estabilidade do sistema, mas também na aceitabilidade biológica em vista da ausência de efeitos tóxicos para o organismo. Dentre as classes de tensoativos, os não iônicos mostram vantagens particulares, pois são vastamente utilizados em formulações tópicas pela sua capacidade de solubilizar insumos farmacêuticos ativos e reduzir a barreira da pele, aumentando assim a penetração e permeação dérmica de fármacos, também possuem a capacidade de manter seu desempenho numa ampla faixa de pH e possuir boa compatibilidade cutânea com baixa toxicidade e irritabilidade (NEVES et al., 2018; CHAMIEH et al., 2016).

Um dos tensoativos escolhidos foi o Kolliphor<sup>®</sup> HS15 (KHS15), tensoativo não iônico hidrossolúvel com um EHL na faixa de 12 a 14. Disponível na forma de uma mistura de mono e diésteres de poliglicol do ácido 12-hidroxiestárico e poli livre etilenoglicol (PEG). Os efeitos do KHS15 em níveis biológicos foram relatados por vários autores e uma das principais propriedades é melhorar a dissolução e a biodisponibilidade de moléculas hidrofóbicas, explicando seu uso como um componente importante de vários sistemas de administração de medicamentos (por exemplo, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas, micelas, micro e nanoemulsões) além de conferir maior estabilidade aos sistemas (GROTZ et al., 2017; HU et al., 2017; MURGIA et al., 2013).

Outro tensoativo escolhido foi o monooleato de sorbitano 80, conhecido como Span 80<sup>®</sup>, ácido graxo de cadeia longa, também da classe de tensoativos não iônicos com EHL

4,3. Trata-se de um excipiente muito útil utilizado em várias formulações farmacêuticas, o mesmo aumenta a solubilidade de drogas em suspensões pouco ou nada solúveis, para a obtenção de dispersões aquosas. Em estudos com óleos vegetais, se mostra responsável por formar camadas interfaciais mais estáveis nas emulsões do tipo O/A (GALVÃO, 2015).

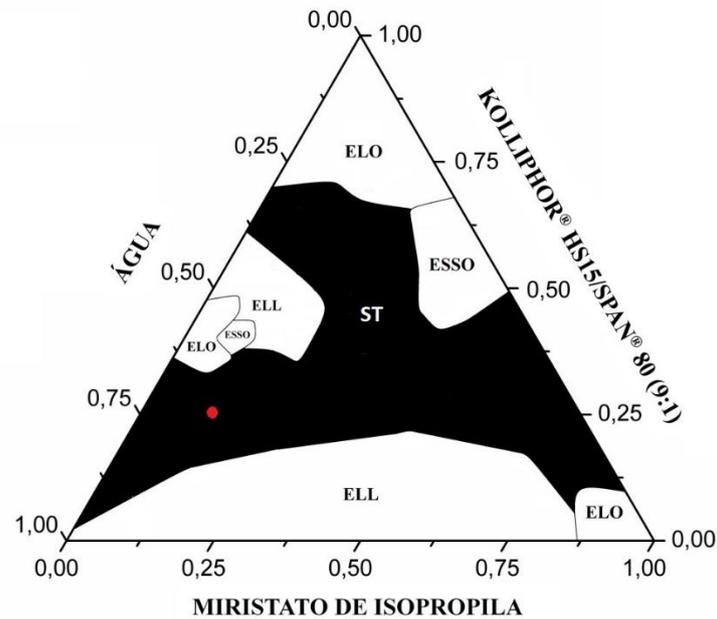
Por atenderem as necessidades, o DFPT foi construído pela mistura de MIP, água destilada, KHS15 e Span 80<sup>®</sup>. Partindo-se do valor requerido do EHL para fase oleosa, construiu-se um diagrama, no qual, a proporção de tensoativos é capaz de fornecer um valor próximo ao do MIP, favorecendo a formação de ME estáveis. Considerando o valor do EHL do tensoativo KHS15 variando de 12 a 14 e o do Span<sup>®</sup> 80 como 4,3, a proporção de 9:1 foi escolhida, pois nesta proporção é possível obter formulações com valor de EHL variando de 10,23 a 13,03, o que engloba o EHL do MIP.

## **5.2 Construção de diagramas de fases**

A construção de DFPT é uma das ferramentas mais utilizadas para o estudo de dispersões, constituídas pela mistura de água, óleo e tensoativos. Esta forma permite determinar as concentrações dos componentes para a formação de ME (XIAO et al., 2019). Por meio desse método, uma representação gráfica dos domínios de regiões de ME pode ser obtida, tendo como vantagem a escolha do ponto mais adequado para incorporação do fármaco. Por ser um método simples e reprodutível foi escolhida a técnica de titulação para construção do DFPT (PINEROS et al., 2017).

Ao analisá-lo é possível definir as várias regiões do diagrama, como: emulsão líquido leitosa, emulsão líquido opaco; emulsão semi-sólida opaca e sistema transparente como representado na Figura 5. A região escura é caracterizada pelos sistemas homogêneos, límpidos e translúcidos.

Figura 5 - Diagrama de fases pseudoternário.



Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: ELL – Emulsão Líquido Leitosa, ELO - Emulsão Líquido Opaca, ESSO - Emulsão Semi-Sólida Opaca, ST - Sistema Transparente, ● - Formulação Microemulsão ME-BR.

### 5.3 Seleção das formulações

A partir da obtenção do DFPT selecionou-se um ponto da região ST, sugestiva de ME, com isto denominada microemulsão branca (ME-BR), correspondente a formulação sem o OEM e posteriormente comprovada como ME através das caracterizações físico-químicas. Seu percentual de composição está descrito na Tabela 2. Foi escolhido o ponto do DFPT que possui um alto teor de fase aquosa, sendo assim, um indicativo de formulações de ME do tipo O/A. Para incorporação do OEM, houve uma redução em igual proporção do MIP.

Tabela 2 - Composição percentual (m/m) das formulações selecionadas.

Componentes	Composição centesimal (%)	
	ME-BR	ME-OEM
Água destilada	60,2	60,2
Miristato de isopropila	14,8	9,8
Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>	-	5
KHS15 <sup>®</sup> /Span 80 <sup>®</sup> (9:1)	25	25

Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: Microemulsão sem óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (ME-BR) e microemulsão contendo o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (ME-OEM).

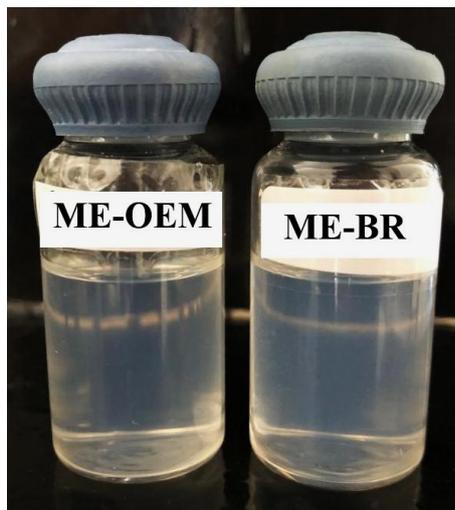
A escolha por ME do tipo O/A pode ser justificada por estes sistemas possuírem um efeito mais pronunciado em relação ao fluxo de permeação e liberação de fármacos quando comparadas com as ME do tipo A/O. A fase externa aquosa ocasiona uma mudança na atividade termodinâmica de fármacos lipofílicos resultando em uma melhor solubilidade e aumento na hidratação cutânea, o que, conseqüentemente, favorece a absorção e biodisponibilidade do fármaco (SHAO; XI; ZHANG et al., 2018).

O sistema O/A também apresenta vantagens em relação à estrutura bicontínua uma vez que esta necessita de elevadas concentrações de tensoativos, o que pode resultar no desenvolvimento de irritação cutânea, por solubilizarem as membranas lipídicas da pele levando à desnaturação das proteínas (LOURENÇO, 2013).

#### 5.4 Caracterização físico-química e morfológica das formulações

A avaliação macroscópica foi realizada 48 h após o preparo dos sistemas. Mesmo com a incorporação do OEM, as amostras permaneceram com as características organolépticas relativas as ME O/A: sistema límpido, transparente, brilhante, homogêneo e fluido (Figura 6). Resultado este, semelhante aos estudos de Neves et al, (2018) em sua ME contendo óleo de *Copaifera multijuga* e Borges (2018) com ME contendo óleo essencial de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi).

Figura 6 - Aspecto macroscópico das formulações.



Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: Microemulsão sem óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (ME-BR) e microemulsão contendo o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (ME-OEM)

A pele apresenta um pH levemente ácido, desempenhando um papel fundamental na homeostase da permeabilidade da barreira e da integridade da camada córnea, quando a pele é exposta a um pH neutro ou alcalino ocorre perturbação do equilíbrio cutâneo, e a função barreira é prejudicada. Já em relação à ME, a análise do pH é um indicativo de estabilidade do sistema. Valores extremamente baixos indicam uma elevada quantidade de ácidos graxos na formulação, oriundos da hidrólise do sistema tensoativo ou da fase oleosa. Alterações no valor de pH de ME podem indicar a ocorrência de reações químicas ou crescimento bacteriano, que podem comprometer a qualidade do produto (REIS, 2019; SAVIĆ et al., 2017).

Portanto, sistemas com pH levemente ácido (4,6 – 5,8) são considerados ideias, pois contribuem para que ocorra proteção da integridade da pele e do chamado “manto ácido cutâneo” e não comprometem a qualidade do produto (LEITE, 2017). Neste estudo, as formulações encontram-se com pH  $6,0 \pm 0,0$  para ME-BR e  $5,8 \pm 0,1$  para ME-OEM, valor na faixa estipulada da literatura para uso cutâneo, concordando com resultados apresentados por Savić et al. (2017), pH entre 5,58 e 5,82, eximindo, desta forma, uma possível irritação cutânea e comprometimento da estabilidade da ME. Os resultados do pH estão expressos na Tabela 3:

Tabela 3 – Caracterização física química e morfológica: pH, condutividade elétrica, índice de refração e tamanho médio de gotículas.

Parâmetro	Formulação	
	ME – BR	ME – OEM
pH	6,0 ± 0,0	5,8 ± 0,1
Condutividade (µS/cm)	195,56 ± 8,20	199,00 ± 0,49
Índice de Refração	1,382 ± 0,000	1,385 ± 0,000
Tamanho médio das gotículas (nm)	24,96 ± 0,10	24,58 ± 0,41

Fonte: dados da pesquisa.

Através da condutividade elétrica pode-se caracterizar o tipo de estrutura formada nas ME. Essa característica é importante para determinar os domínios contínuos oleosos ou aquosos, podendo-se a partir disso avaliar o tipo de ME quanto à fase dispersa e dispersante (NAOUI et al., 2011).

Sistemas A/O são caracterizados por baixos valores de condutividade. Considerando que nestes sistemas as gotículas de líquido iônico são isoladas umas das outras em uma fase oleosa contínua não condutora. De modo contrário, sistemas O/A denotam altos valores de condutividade, por constituírem sistemas contínuos em água possuindo, desta forma, efeito condutor em decorrência da grande quantidade de íons livre (POH et al., 2019)

Como podem ser observados na Tabela 3, os altos valores de 195,56 µS/cm para (ME-BR) e 199,0 µS/cm para (M-OEM) obtidos na condutividade das formulações em estudo, sugerem que se trata de um sistema O/A, tanto na presença, como na ausência do OEM. Resultados semelhantes aos de Tao et al. (2018), com sistemas O/A que apresentaram valores de condutividade entre 187-196 µS/cm, refletindo a natureza contínua em água das ME estudadas.

O índice de refração (IR) consiste na relação entre as velocidades da luz entre dois meios pelos quais ela se propaga. Substâncias consideradas isotrópicas como ME, possuem índice de refração único e constante em determinado comprimento de onda, temperatura e pressão, de modo que o raio de luz incidente se propaga pela substância com a mesma velocidade em todas as direções, sendo, desta forma, um parâmetro importante na avaliação da estabilidade, pois permite a detecção de processos de inversão de fase, monitorando mudanças no desvio do plano de luz incidente de ME (CIRIACO et al., 2019).

Como exposto na Tabela 3, o IR da ME-BR ( $1,382 \pm 0,00$ ) e ME-OEM ( $1,385 \pm 0,00$ ) estão próximos ao da água purificada (1,3325) e distante do MIP (1,4320 – 1,4360) em decorrência da grande quantidade de fase aquosa nas formulações. O que revela ser um sistema O/A assim como encontrado por Dehghani et al. (2017) com IR 1,39. Pode-se observar ainda que a incorporação do OEM não interferiu no IR da ME quando comparada a ME-BR indicando que o óleo não causa perturbações no sistema.

Por ser um sistema isotrópico, com o diâmetro médio das gotículas menor que  $\frac{1}{4}$  de luz incidente, um parâmetro importante a ser avaliado é o tamanho médio de gotículas (TMG). Segundo Rashid et al. (2019) o valor proposto para os sistemas de ME está na faixa de 5-200 nm, o que confere resistência à separação gravitacional e, conseqüentemente, aumento da estabilidade. As formulações apresentaram resultados que comprovam ser um sistema microemulsionado, apresentando TMG de  $24,96 \pm 0,10$  e  $24,58 \pm 0,41$  nm para ME-BR e ME-OEM, respectivamente. Como pode ser observada na Tabela 3 a adição do OEM não ocasionou uma diferenciação significativa do TMG da ME-OEM comparada a ME-BR.

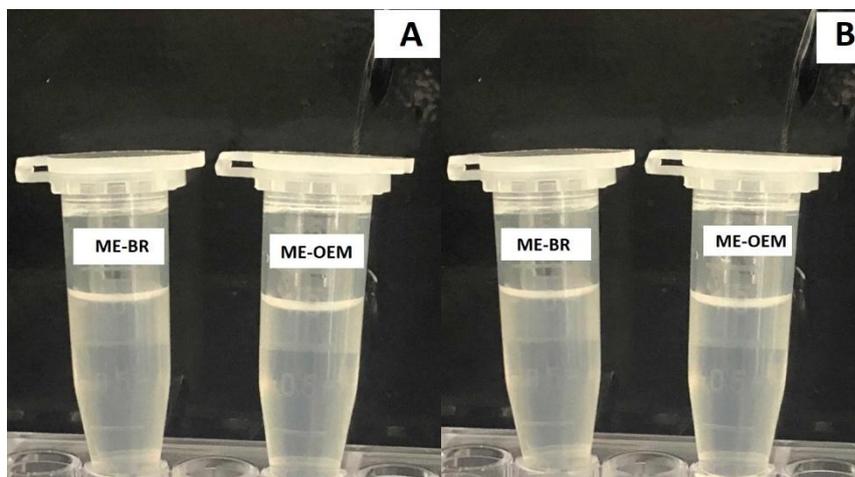
## **5.5 Avaliação da estabilidade preliminar das formulações**

### **5.5.1 Teste de centrifugação**

A centrifugação gera um estresse na amostra, fazendo uma simulação do aumento na força gravitacional, aumentando, conseqüentemente, a mobilidade das gotículas e prevendo possíveis instabilidades. As instabilidades são observadas na forma de separação de fases, precipitação, coalescência, entre outras e qualquer sinal de mudança no aspecto visual do sistema indica necessidade de reformulação (REIS et al., 2017).

Na Figura 7 é apresentado os resultados do teste mostrando que as ME permanecem estáveis com a centrifugação. Não houve separação de fases e a incorporação do OEM foi adequada não ocasionando alterações em sua estabilidade.

Figura 7 - Formulações após centrifugação.



Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: formulações após centrifugação 13.000 rpm por 30 min (A), formulações após centrifugação 13.000 rpm por 60 min (B).

#### 5.5.2 Estresse térmico

O teste de estresse térmico é uma ferramenta útil para análise da susceptibilidade de ME, pois se aplicam condições extremas de temperatura em períodos pré-determinados de tempo, permitindo o incremento da energia cinética no sistema e estimando a ocorrência de possíveis processos de instabilidades durante armazenamento (GALVÃO, 2015).

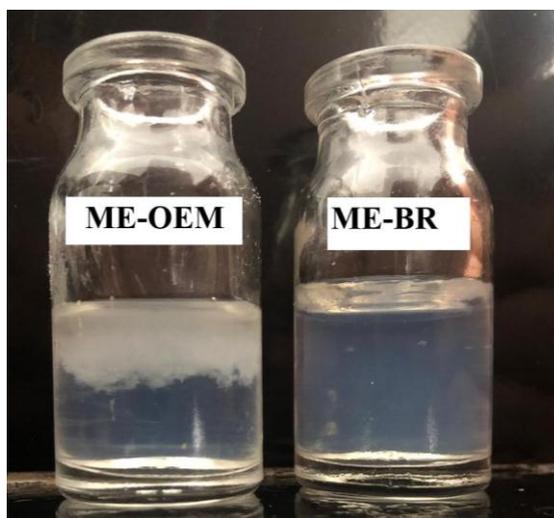
Tanto a ME-BR, quanto a ME-OEM mantiveram-se estáveis até 55 °C. Quando as formulações foram submetidas à temperatura de 60 °C, elas apresentaram turvação e aos 70 °C ocorreu separação de fases, permanecendo assim até os 80° C. A Figura 8 mostra o resultado final com a separação de fases do sistema na temperatura de 80° C,.

O aumento da turvação das amostras pode estar relacionado às propriedades intrínsecas dos tensoativos utilizados, isto porque tensoativos não iônicos contendo óxido de etileno, exibem um o comportamento de solubilidade reverso em água com a elevação da temperatura, ocasionando a turvação dos sistemas nos quais estão inseridos (ASSIS, 2017)

Foi possível também observar um fenômeno de instabilidade conhecido como separação de fases que, segundo Callender et al. (2017), ocorre devido a sensibilidade das ME a mudanças de temperatura. O sistema apresenta diversas forças, como a de formação de barreira mecânica e de repulsão eletrostática entre gotículas e fase aquosa, que podem

ser rompidas por diversos fatores, entre estes: exposição a temperaturas mais altas ou inferiores às temperaturas normais que, eventualmente, leva a quebra da ME.

Figura 8 - Formulações após estresse térmico.



Fonte: dados da pesquisa.

Um fato positivo ocorreu após o resfriamento das amostras, pois elas voltaram a apresentar-se límpidas, transparentes, brilhantes, homogêneas e flúidas, com aspecto semelhante ao iniciar este experimento

### 5.5.3 Ciclo resfriamento/aquecimento

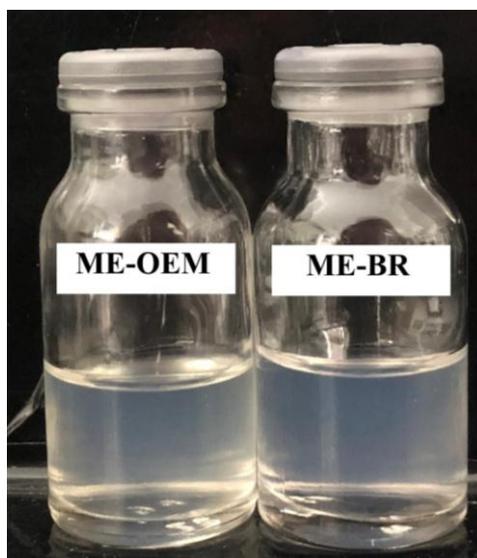
O teste do ciclo resfriamento/aquecimento utiliza condições drásticas de temperatura para elevar a velocidade de degradação química e favorecer alterações físicas de substâncias e/ou modificações na forma farmacêutica ou cosmética, usando condições extremas de armazenamento. Portanto, esse teste tem como objetivo avaliar se os limites extremos de frio e calor são capazes de desestabilizar sistemas e predizer o prazo de validade das preparações farmacêuticas (CAVALCANTI et al., 2016).

As formulações não evidenciaram visualmente indícios de instabilidade (Figura 9). Como também não houve modificações significativas no seu pH, condutividade elétrica e IR (Tabela 4).

Para os valores de IR e condutividade não houve variação significativa, e como discutido anteriormente, ainda apontam sistema O/A. Com relação ao pH, houve uma redução de 6,0 e 5,8 para 5,81 e 5,58 nas ME-BR e ME-EOM, respectivamente. Com tudo,

as formulações ainda se encontram na faixa indicada para uso tópico cutâneo, como as ME desenvolvidas por Neves et al. (2018), que apresentaram valores entre 5,25 e 5,74.

Figura 9 - Formulações após ciclo resfriamento/aquecimento



Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 4 – pH, condutividade elétrica e índice de refração, após ciclo resfriamento/aquecimento.

Parâmetro	Formulação	
	ME – BR	ME – OEM
pH	5,81 ± 0,008	5,58 ± 0,003
Condutividade (µS/cm)	197,65 ± 3,8	201,40 ± 0,97
Índice de Refração	1,383 ± 0,00	1,385 ± 0,00

Fonte: dados da pesquisa.

## 5.6 Avaliação da atividade antimicrobiana

Normalmente são encontradas em feridas o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo as principais espécies *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, e segundo Zhang et al. (2018) são bactérias sensíveis a ação do OEM com testes *in vitro* exibindo ação antioxidante e antimicrobiana. Por isso, foram as cepas escolhidas para análise da atividade antibacteriana do OEM incorporado na ME.

A utilização dos testes antibacterianos *in vitro* tem como propósito fornecer um provável resultado da infecção bacteriana quando exposta ao tratamento do agente testado.

De uma forma mais simples, espera-se que os resultados *in vivo* sejam similares aos evidenciados em estudo *in vitro* (REIS et al., 2017).

Dentre os métodos utilizados para avaliar a susceptibilidade de cepas bacterianas, o método de microdiluição em caldo foi o teste de escolha por ser um método simples e eficaz, além de ser apropriado para determinação do CIM, considerada como a menor concentração do OEM capaz de inibir a multiplicação bacteriana (COSTA, 2019).

Evidenciou-se que as condições utilizadas foram adequadas para o crescimento bacteriano, uma vez que o controle realizado em poços contendo apenas o meio de cultura e o inóculo demonstrou crescimento, fato este não observado nos poços de controle apenas com o caldo. Na Tabela 5 encontra-se os resultados do crescimento das amostras testadas, nela pode-se observar que a ME-BR apresentou crescimento bacteriano, comprovando que o MIP e os tensoativos utilizados na formulação não possuem efeito antimicrobiano.

Tabela 5 – Determinação da concentração inibitória mínima das cepas bacterianas testadas.

<b>Cepas bacterianas</b>	<b>ME- OEM [CIM (mg/mL)]</b>	<b>ME-BR [CIM (mg/mL)]</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	25,0 (50%)	R
<i>Escherichia coli</i>	25,0 (50%)	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,5 (25%)	R

Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: R= resistência microbiana; CIM: concentração inibitória mínima.

Segundo Giappo et al. (2019) a ação antimicrobiana do OEM estaria relacionada à sua intervenção na camada de fosfolipídios da membrana celular bacteriana devido ao seu caráter lipofílico, responsável por causar perda da integridade da membrana celular, levando ao extravasamento do seu conteúdo, inibição da respiração e a quebra da homeostase celular.

Foi verificado neste estudo que o OEM demonstrou atividade para as cepas Gram-negativas e Gram-positiva na concentração de 25 mg/mL (diluição até 50%) para *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 27853) e 12,5 mg/mL (diluição até 25%) para *P. aeruginosa* (ATCC 25922). Esse achado era parcialmente esperado, pois já se sabe que a maioria dos efeitos de compostos naturais e, em particular, de óleos essenciais, são dependentes da concentração (CHOUHAN et al., 2017).

No estudo de Costa (2019) foram necessárias concentrações de 14,9 mg/mL e 30,4 mg/mL do OEM para inibir a multiplicação dos patógenos avaliados. Já no estudo de Ogbaini-Emovon et al. (2015) utilizando a técnica de disco-difusão com isolados multirresistentes, entre eles de *E. coli* ESBL, foram usadas emulsões preparadas com até 10% de OEM.

Observa-se que a *P. aeruginosa* foi, entre as bactérias testadas, mais susceptível a ação da ME-OEM, em pesquisas recentes de Brunn et al. (2018) foi demonstrado ação inibitória para *P. aeruginosa* com OEM a 2%.

Por outro lado, na análise da atividade antifúngica da ME-OEM foi encontrado fortes efeitos para *Candida albicans* com CIM 1,56 mg/mL (diluição até 3,12 %). Como descrito na Tabela 6.

A ME-BR novamente não apresentou atividade, confirmando assim que a CIM encontrada para cepa de *C. albicans* (ATCC 10231) está relacionada apenas ao óleo contido nas gotículas da ME-OEM. Para controle negativo foi utilizado apenas o meio de cultura e para o controle positivo foi utilizado o meio de cultura acrescido do inóculo bacteriano.

Tabela 6 – Determinação da concentração inibitória mínima da cepa fúngica testada.

<b>Cepa fúngica</b>	<b>Formulação ME- OEM (CIM)</b>	<b>Formulação ME-BR</b>
<i>Candida albicans</i>	1,56 mg/mL (3,12%)	R

Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: R= resistência microbiana; CIM: concentração inibitória mínima.

Esta levedura foi escolhida para a análise por ser potencialmente patogênica em diferentes sítios no hospedeiro. Isto ocorre quando há depressão do sistema imunológico, ou quando há comprometimento de barreiras anatômicas devido a queimaduras ou procedimentos médicos invasivos. Atualmente, infecções relacionadas à *Candida* afetam 65% dos indivíduos HIV positivos (SERRA et al., 2018)

O OEM em vários estudos demonstra grande atividade frente a fungos desse gênero. Mahizan et al. (2019) cita a atividade *in vivo* do monoterpene terpinen-4-ol, principal constituinte bioativo do OEM, contra espécies de *Candida* patogênicas humanas suscetíveis e resistentes a azóis, exibindo capacidade de eliminar um modelo bem estabelecido de candidíase vaginal em ratos. Ainda é defendida terapia combinada, entre compostos naturais e medicamentos, como capaz de recuperar a perda de função dos agentes

antimicrobianos existentes, potencializando a ação dos medicamentos (MAHIZAN et al., 2019).

Fato este comprovado ao OEM no estudo de Mertas et al. (2015), que avaliou a susceptibilidade de cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol, quando expostas a fluconazol em combinação com este óleo. Na classificação dos isolados, 62,5% foram suscetíveis e 25,0% exibiram suscetibilidade intermediária. Em trabalho publicado por Di Vito et al. (2015) no desenvolvimento de um supositório vaginal para o tratamento da candidíase vulvo vaginal, também foi visto a combinação do OEM com anfotericina-B contra diferentes espécies de *Candida*.

Mesmo com valores altos de CIM comparado a fármacos utilizados no tratamento de infecções fúngicas, ele mostra-se mais vantajoso a longo prazo. Em estudos investigando a impregnação de próteses dentárias com OEM e com fluconazol, a CIM do óleo foi 6 vezes maior que a CIM do fluconazol. Porém, o fluconazol perdeu sua atividade antifúngica após 7 dias, enquanto o OEM não (FELIPE et al., 2018)

Rasteiro et al. (2014) analisando a atividade do OEM para o tratamento da candidíase oral, encontrou a CIM 1,95 mg/mL, já nos resultados de Serra et al. (2018) que avaliou vários óleos essenciais frente a cepas de *C. albicans*, encontrou para o OEM a CIM de 1,8 mg/mL.

Estes resultados além de confirmarem a alta atividade do OEM como um composto natural promissor a ser explorado, evidenciam que o sistema microemulsionado não interfere na atividade antimicrobiana do OEM, apresentando resultados similares a estudos anteriores. E como exposto por Flores et al. (2015), que empregou a nanoencapsulação do OEM, o uso desses sistemas fornece proteção às propriedades do óleo reduzindo consideravelmente a sua volatilidade.

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- a) A construção do DFPT composto por água destilada, MIP e KSH15/Span<sup>®</sup> 80 na proporção 9:1, foi de grande importância para identificação da região de formação de ME para incorporação do OEM;
- b) A incorporação do OEM na concentração de 5% na fase oleosa do sistema foi eficiente e não alterou suas características macroscópicas;
- c) O pH das formulações propostas enquadrou-se dentro da faixa de pH ótimo para permitir o uso por via tópica cutânea;
- d) A partir das propriedades físico-químicas foi possível classificar em sistemas microemulsionados O/A;
- e) O TMG das formulações tanto sem e com o OEM foram inferiores a 200 nm, e assim indicando serem ME;
- f) As ME apresentaram estabilidade preliminar diante dos testes de centrifugação e ciclo aquecimento/resfriamento;
- g) Foi verificado que a ME-OEM demonstrou ser eficaz *in vitro* contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, mostrando-se um promissor sistema de veiculação do OEM para o tratamento de infecções cutâneas por estes microrganismos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, C. D. S. F., BATISTA, N. F., LASAKOSVITSCH, P. R., DE SOUZA ANTUNES, V. M., & OLIVEIRA, C. R. Avaliação da citotoxicidade do tea tree oil e sua ação antimicrobiana em bactéria *Propionibacterium acnes*. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 13-13, 2018.
- ASSIS, K. M. A. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia***. 2017. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.
- BACCOLI, B. C.; SCIANI, M. D.; CARVALHO, A. A. Os benefícios do óleo de melaleuca na acne grau ii e iii: uma revisão de literatura. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 13, n. 1, p. 536-547, 2015.
- BLASKOVICH, M. A. T.; BUTLER, M. S.; COOPER, M. A. Polishing the tarnished silver bullet the quest for new antibiotics. **Essays In Biochemistry**, Brisbane, v. 61, n. 1, p. 103-114, 2017.
- BORGES, J. C. **Atividade cicatrizante e antimicrobiana de microemulsões contendo o óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi**. 2018. 55f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2018.
- BRUN, P.; BERNABÈ, G.; FILIPPINI, R.; PIOVAN, A. In vitro antimicrobial activities of 29 commercially available tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oils. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Padova, v. 76, n. 1, p. 108-116, 2019.
- CALLENDER, S. P.; MATHEWS, J. A.; KOBERNYK, K.; WETTIG, S. D. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 526, n. 1-2, p. 425-442, 2017.
- CAVALCANTI, A. L. M.; REIS, M. Y. F. A.; SILVA, G. C. L.; RAMALHO, Í. M. M.; GUIMARÃES, G. P.; SILVA, J. A.; SARAIVA, K. L. A.; DAMASCENO, B. P. G. L. Microemulsion for topical application of pentoxifylline: *in vitro* release and *in vivo* evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 506, n. 1-2, p. 351-360, 2016.
- CHAMIEH, J.; JANNIN, V.; DEMARNE, F.; COTTET, H. Hydrodynamic size characterization of a self-emulsifying lipid pharmaceutical excipient by Taylor dispersion analysis with fluorescent detection. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 513, n. 1-2, p. 262-269, 2016.
- CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of some essential oils present status and future perspectives. **Medicines**, London, v. 4, n. 3, p. 58, 2017
- CIRÍACO, S. L.; CARVALHO, I. P. S.; NETO, J. A. T.; NETO, J. D. S. L.; DE OLIVEIRA, D. H. B.; CUNHA, A. P. G. P; MORENO, M. Z. D. L. C. Development of

microemulsion of tamsulosin and dutasteride for benign prostatic hyperplasia therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, New York, v. 185, p. 110573, 2019.

CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard-- Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2012.

COHEN, T. S.; HILLIARD, J. J.; JONES-NELSON, O.; KELLER, A. E.; O'DAY, T.; TKACZYK, C.; DIGIANDOMENICO, A.; HAMILTON, M.; PELLETIER, M.; WANG, Q.; DIEP, B. A.; LE, V. T. M.; CHENG, L.; SUZICH, J.; STOVER, C. K.; SELLMAN, B. R. Staphylococcus aureus  $\alpha$  toxin potentiates opportunistic bacterial lung infections. **Science Translational Medicine**, Washington, v. 8, n. 329, p. 329-331, 2016.

CUNHA, K. F. **Potencial antibacteriano do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel e desenvolvimento de filmes ativos para aplicação em alimentos.** 2019. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

DAMASCENO, B. P. G. L.; DOMINICI, V. A.; URBANO, I. A.; SILVA, J. A.; ARAÚJO, I. B.; SANTOS, M. N. S.; SILVA, A. K. A.; MEDEIROS, A. C.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, S. T. Amphotericin B microemulsion reduces toxicity and maintains the efficacy as an antifungal product. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, Stevenson Ranch, v. 8, n. 2, p. 290-300, 2012.

DEGHANI, F.; FARHADIAN, N.; GOL MOHAMMADZADEH, S.; BIRIAEE, A.; EBRAHIMI, M.; KARIMI, M. Preparation, characterization and *in vivo* evaluation of microemulsions containing tamoxifen citrate anti-cancer drug. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 96, p. 479-489, 2017.

DI VITO M.; MATTARELLI P.; MODESTO M. Atividade *in vitro* de supositórios vaginais de óleo de tea tree contra *Candida* spp. e microbiota vaginal probiótica. **Phytotherapy Research**, New York, v. 29, n. 10, p. 1628-1633, 2015.

DING, C.; LI, Z. A review of drug release mechanisms from nanocarrier systems. **Materials Science and Engineering C**, Amsterdam, v. 76, p. 1440-1453, 2017.

ELMI, A.; PROSPERI, A.; ZANNONI, A.; BERTOCCHI, M.; SCORPIO, D. G.; FORNI, M.; VENTRELLA, D. Antimicrobial capabilities of non-spermicidal concentrations of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on the liquid phase of refrigerated swine seminal doses. **Research in Veterinary Science**, [S.I.] v. 24, n. 6, p. 1071, 2018.

FELIPE, L. D. O.; SILVA JÚNIOR, W. F. D.; ARAÚJO, K. C. D.; FABRINO, D. L. Lactoferrin, chitosan and *Melaleuca alternifolia*-natural products that show promise in candidiasis treatment, **Brazilian journal of microbiology**, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 212-219, 2018.

FELIX, T.C.; RÖDER, D.V.; PEDROSO, R.D. Alternative and complementary therapies for vulvovaginal candidiasis. **Folia Microbiologica**, Berlin, v. 64, n. 2, p. 133-141, 2019.

FLORES, F. C.; LIMA, J. A.; SILVA, C. R.; BENVEGNÚ, D.; FERREIRA, J.; BURGER, M. E.; SILVA, C. D. B. Hydrogels containing nanocapsules and nanoemulsions of tea tree oil provide antimutagenic effect and improved skin wound healing. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, New York, v. 5 n. 1, p. 800-809, 2015.

GALVÃO, K. C. S. **Desenvolvimento de nanoemulsão para uso em alimentos e uso tópico**. 2015. 215f. Tese (Doutor em Ciências) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

GIOPPO, A.; ZANCANARO, V.; BELLAVER, E. H. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* frente a isolados multirresistentes produtores de ESBL e KPC causadores de infecções hospitalares. **Biotemas**, Florianópolis, v. 32, n. 3, p. 35-42, 2019

GUIMARÃES, G. P. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsão antifúngica contendo derivado do tiofeno**. 2013. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

GROTZ, E.; BERNABEU, E.; PAPPALARDO, M.; CHIAPPETTA, D. A.; MORETTON, M. A. Nanoscale Kolliphor® HS 15 micelles to minimize rifampicin self-aggregation in aqueous media. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Paris, v. 41, p. 1-6, 2017.

HOMEYER, D. C.; SANCHEZ, C. J.; MENDE, K.; BECKIUS, M. L.; MURRAY, C. K.; WENKE, J. C.; AKERS, K. S. *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on filamentous fungi and human cell toxicity, **Medical Mycology**, Fort Sam Houston, v. 53, n. 3, p. 285-294, 2015.

HOLMES, C. J.; PLICHTA, J. K.; GAMELLI, R. L.; RADEK, K. A. Dynamic role of host stress responses in modulating the cutaneous microbiome: implications for wound healing and infection, **Advances in Wound Care**, New York, v. 4, n. 1, p. 24-37, 2015.

HU, L.; ZHANG, J.; ZHU, C.; PAN, H. C.; LIU, H. Effect of the additives on clouding behavior and thermodynamics of coenzyme Q10-Kolliphor HS15 micelle aqueous solutions. **Chemical Physics Letters**, Amsterdam, v. 687, p. 264-269, 2017.

JAIN, K.; MEHRA, N. K.; JAIN, N. K. Nanotechnology in drug delivery: safety and toxicity issues. **Current Pharmaceutical Design**, Hilversum, v. 21 n. 9, p. 4252-4261, 2015.

KASKATEPE, B.; KIYMACI, M. E.; SUZUK, S.; ERDEM, S. A.; CESUR, S.; YILDIZ, S. Antibacterial effects of cinnamon oil against carbapenem resistant nosocomial *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Industrial Crops and Products**, New York, v. 81, p. 191-194, 2016.

KAUR, G. MEHTA, S. K. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 529, n. 1-2, p. 134-160, 2017.

LACERDA, L.C.C. **Bactérias associadas à feridas cutâneas agudas e crônicas em cães.** 2018. 82f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2018.

LAHKAR, S.; DAS, M. K.; BORA, S. An Overview on Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Oil. **International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Reserach**, Assam, v. 3, n. 3, p, 250-253, 2013.

LEITE, J. M. S. **Desenvolvimento e caracterização de um sistema microemulsionado contendo dexametasona.** 2017, 52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.

LOURENÇO, A. R.N. **Administração tópica de fármacos - das restrições aos desafios.** 2013. 51f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa, 2013.

SHAO, H.; XI, N.; ZHANG, Y. Microemulsion formulation of a new biopesticide to control the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Scientific reports**, London, v. 8, 2018

MAHIZAN, N. A; YANG, S. K; MOO, C. L; SONG, A. A. L; CHONG, C. M; CHONG, C. W; LAI, K. S. Derivados de terpenos como potencial agente contra patógenos de resistência antimicrobiana (AMR). **Molecules**, New York, v. 24, n. 14, p. 2631, 2019.

MARTINS, N.; BARROS, L.; HENRIQUES, M.; SILVA, S.; FERREIRA, C. I. F. R. Activity of phenolic compounds from plant origin against Candida species. **Industrial Crops and Products**, New York, v. 74, p. 648-670, 2015.

MERTAS, A.; GARBUSIŃSKA, A.; SZLISZKA, E.; JURECZKO, A.; KOWALSKA, M.; KRÓL, W. The influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on fluconazole activity against fluconazole-resistant Candida albicans strains. **BioMed research international**, New York, v, 2015, 2015.

MIRANDA, S. H. S. **Desenvolvimento do método de extração em solução hexânica e identificação dos compostos do óleo de *Melaleuca alternifolia*.** 2014. 47F. Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

MIRANTE, D. C. **Desenvolvimento do método de extração em solução hexânica e identificação dos compostos do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (*Myrtaceae*).** 2015, 89f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

MIAO, L.; ZHU, L.; LIU, B.; DU, L.; JIA, X.; HAN, L.; JIN, Y. Tea tree oil nanoemulsions for inhalation therapies of bacterial and fungal pneumonia. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, New York, v.141, p. 408-416, 2016.

MOURI, A.; LEGRAND, P.; GHZAOUI, A. E.; DORANDEU, C.; MAUREL, J. C.; DEVOISSELLE, J. Formulation, physicochemical characterization and stability study of

- lithium-loaded microemulsion system. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 502, n. 1-2, p. 117-124, 2016.
- MURGIA, S.; FADDA, P.; COLAFEMMINA, G.; ANGELICO, R.; CORRADO, L.; LAZZARI, P.; PALAZZO, G. Characterization of the Solutol® HS15/water phase diagram and the impact of the  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol solubilization. **Journal of colloid and interface science**, Amsterdam, v. 390, n. 1, p. 129-136, 2013.
- NAOUI, W.; BOLZINGER, M.A.; FENET, B.; PELLETIER, J.; VALOUR, J.P.; KALFAT, R.; CHEVALIER, Y. Microemulsion Microstructure Influences the Skin Delivery of an Hydrophilic Drug. **Pharmaceutical Research**, Dordrecht, v. 28, n. 7, p. 1683-1695, 2011.
- NASTITE, C. M. R. R.; P, T.; ABD, E.; GRICE, J. E.; BENSON, H. A. E.; ROBERTS, M. S. Topical nano and microemulsion for skin delivery. **Pharmaceutics**, Washington, v. 9, n. 4, p.37-41, 2017.
- NEVES, J. K. O.; APOLINÁRIO, A. C.; SARAIVA, K. L. A.; SILVA, D. T. C.; REIS, M. Y. F. A.; DAMASCENO, B. P. G. L.; PESSOA-JÚNIOR, A.; GALVÃO, M. A. M.; SOARES, L. A. L.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; SILVA, J. A.; CONVERTI, A. Microemulsions containing *Copaifera multijuga* hayne oil-resin: challenges to achieve an efficient system for  $\beta$ -caryophyllene delivery. **Industrial Crops and Products**, New York, v. 111, p. 185-192, 2018.
- OGBAINI-EMOVON, E.; SCHUSTER, H.; WAZE, J.; KALU, E. I. In vitro antimicrobial activity of commercially available *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on some selected clinical pathogens. **British Journal of Pharmaceutical Research**, London, v. 5, n. 3, p. 202-208, 2015.
- OLIVA, A., COSTANTINI, S., ANGELIS, M., GARZOLI, S., BOZOVIC, M., MASCELLINO, M. T., VULLO, V.; RAGNO, R. High potency of *Melaleuca alternifolia* essential oil against multi-drug resistant Gram-negative bacteria and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, New York, v. 23, n. 10, p. 2584, 2018.
- OLIVEIRA, A. C. **Avaliação da aplicação de microemulsão, nanoemulsão e solução de tensoativo na recuperação avançada de petróleo**. 2015. 64f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química do Petróleo) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.
- PACHAVA, K. R.; NADENDLA, L. K.; ALLURI, L. S. C.; TAHSEEN, H.; SAJJA, N. P. In vitro antifungal evaluation of denture soft liner incorporated with tea tree oil: A new therapeutic approach towards denture stomatitis. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, [S.l.] v. 9, n. 6, p. ZC62, 2015.
- RASTEIRO, V. M. C.; COSTA, A. C. B. P.; ARAÚJO, C. F.; BARROS, P. P.; ROSSONI, R. D.; ANBINDER, A. L.; JUNQUEIRA, J. C. Essential oil of *Melaleuca alternifolia* for the treatment of oral candidiasis induced in an immunosuppressed mouse model. **BMC complementary and alternative medicine**, London, v. 14, n. 1, p. 489, 2014.

PERRICONE, M.; ARACE, E.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M.; BEVILACQUA, A. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 6, p. 1-7, 2015.

PRETO, V.L.S.M. **Desenvolvimento de microemulsões para aplicação tópica**. 2016. 94f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Escola Superior de Tecnologia e de Gestão do Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2016.

PINEROS, I.; SLOWING, K.; SERRANO, D. R.; PABLO, E.; BALLESTEROS, M. P. Analgesic and anti-inflammatory controlled-released injectable microemulsion: Pseudo-ternary phase diagrams, *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 101, p. 220-227, 2017.

PIRES, V. C. **Avaliação do potencial larvicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e sua formulação em nanocápsulas poliméricas**. 2019. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

POH, Y.; N, G. S.; H, O. K.; Formulation and characterisation of 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate-in-oil microemulsions as the potential vehicle for drug delivery across the skin barrier. **Journal of Molecular Liquids**, New York, v. 273, p. 339-345, 2019.

POOMANEE, W.; CHAIYANA, W.; WICKETT, R. R.; LEELAPORNPID, P. Stability and solubility improvement of Sompoi (*Acacia concinna* Linn.) pod extract by topical microemulsion. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Kerala, v. 12, n. 4, p. 386-393, 2017.

RAMADAN, M. A.; SHAWKEY, A. E.; RABEH, M. A.; ABDELLATIF, A. O. Atividades antimicrobianas promissoras de nanopartículas de óleo e prata obtidas a partir de folhas de *Melaleuca alternifolia* contra patógenos infectantes da pele selecionados. **Journal of Herbal Medicine**, Munich, p. 100289, 2019.

RASHID, M. A.; NAZ, T.; ABBAS, M.; NAZIR, S.; YOUNAS, N.; MAJEED, S.; QURESHI, N.; AKHTAR, M. N. Chloramphenicol loaded microemulsions: development, characterization and stability. **Colloid and Interface Science Communications**, Amsterdam, v. 28, p. 41-48, 2019.

REIS, L. A. P.; **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões de óleo de abacate para uso cosmético**. 2019. 51 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Engenharia Química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2019.

REIS, M. Y. F. A.; DOS SANTOS, S.M.; SILVA, D. R.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S.; NAVARRO, D.M.A.F.; SANTOS, G. K. N.; HALLWASS, F.; BIANCHI, O.; SILVA, A. G.; MELO, J. V.; MATTOS, A. B.; XIMENES, R. M.; MACHADO, G.; SARAIVA, K. L. Anti Inflammatory Activity of Babassu Oil and Development of a Microemulsion System for Topical Delivery. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, England, p.1-14, 2017.

- REYES, A. M. P.; OLVERA, M. L. Synthesis of ZnO nanoparticles from water-in-oil (w/o) microemulsions. **Materials Chemistry and Physics**, New York, v. 203, p. 141-147, 2018.
- ROBERTS, M.S; MOHAMMED, Y.; PASTODE, M. N.; NAMJOSHI, S.; OUSEF, S.; ALINAGHI, A.; HARIDASS, I. N.; ABD, E.; LEITE-SILVA, V.R.; BENSON, H.; GRICE, J. E. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. **J. Control**, New York, v. 247, p. 86-105, 2017.
- RUDKIN, J. K.; MCLOUGHLIN, R. M.; PRESTON, A.; MASSEY, R. C. Bacterial toxins: Offensive, defensive, or something else altogether? **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 13, n. 9, p. e1006452, 2017.
- SAVIĆ, V.; TODOSIJEVIĆ, M.; ILIĆ, T.; LUKIĆ, M.; MITSOU, E.; PAPADIMITRIOU, V.; SAVIĆ, S. Microemulsões biocompatíveis à base de lecitina carregadas com tacrolimus com melhor penetração na pele: caracterização da estrutura e desempenho in vitro / in vivo. **International journal of pharmaceutics**, Amsterdam, v. 529, n. 1-2, p. 491-505, 2017.
- SERRA, E.; HIDALGO-BASTIDA, L.; VERRAN, J.; WILLIAMS, D.; MALIC, S. Antifungal activity of commercial essential oils and biocides against *Candidaalbicans*. **Pathogens**, Basel, v. 7, n. 1, p. 15, 2018.
- SILVA, J. D. F.; SILVA, Y. P.; PIATNICKI, C. M. S.; BÖCKEL, W. J.; MENDONÇA, C. R. B. Microemulsão: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 9, p. 1-11, 2015.
- SINDHU, P.; KUMAR, S.; IQBAL, B.; ALI, J.; BABOOTA, S. Duloxetine loaded-microemulsion system to improve behavioral activities by upregulating serotonin and norepinephrine in brain for the treatment of depression. **Journal of Psychiatric Research**, Oxford, v. 99, p. 83-95, 2018.
- SOUZA, C. F.; BALDISSERA, M. D.; SILVA, L. D. L.; GEIHS, M. A.; BALDISSEROTTO, B. Is monoterpene terpinen-4-ol the compound responsible for the anesthetic and antioxidant activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil (tea tree oil) in silver catfish? **Aquaculture**, New York, v. 486, p. 217-223, 2018.
- SHUKLA, T.; UPMANYU, N.; AGRAWAL, M.; SARAF, S.; ALEXANDER, A. Biomedical applications of microemulsion through dermal and transdermal route. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Amsterdam, v. 108, p. 1477- 1494, 2018.
- SAMPAIO, P. S.; SANCHO, L. G.; LAGO, R. F. Implementação da nova regulamentação para prescrição e dispensação de antimicrobianos: possibilidades e desafios. **Caderno Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.26, n.1, p.15-22, 2018.
- TAO, J.; ZHENG, Z.; GUO, F.; CHEN, J. Formulation of a 7,2',4'-trihydroxyflavanone oil-in-water microemulsion using aqua coconut oil: characterization, stability, and antibrowning effects on fresh apple juice. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 93, p. 181-188, 2018.

TAO, J.; ZHU, Q.; QIN, F.; WANG, M.; CHEN, J.; ZHENG, Z. Preparation of steppogenin and ascorbic acid, vitamin E, butylated hydroxytoluene oil-in-water microemulsions: characterization, stability, and antibrowning effects for fresh apple juice. **Food Chemistry**, Barking, v. 224, p. 11-18, 2017.

TORRES, S.; CLAYTON, J. B.; DANZEISEN, J. L.; WARD, T.; HUANG, H.; KNIGHTS, D.; JOHNSON, T. J. Diverse bacterial communities exist on canine skin and are impacted by cohabitation and time. **PeerJ**, Corte Madera, v. 5, p. e3075, 2017.

TURCHI, B.; MANCINI, S.; PISTELLI, L.; NAJAR, B.; CERRI, D.; FRATINI, F. Sub19 inhibitory stress with essential oil affects enterotoxins production and essential oil 20 susceptibility in *Staphylococcus aureus*. **Natural Products Research**, Richmond v. 32, n. 6, p. 682-21 688, 2018.

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. **Pharmacy and Therapeutics**, Yardley, v. 40, n. 4, p. 277-283, 2015.

XIAO, X.; WANG, F.; ZHOU, J.; LUO, J.; LI, J.; YI, X. Entrega oral de óleo de semente de coix em microemulsão o / a: preparação, caracterização e avaliação in vitro e in vivo. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Paris, v. 54, p. 101325, 2019.

YADAV, E.; KUMAR, S.; MAHANT, S.; KHATKAR, S.; RAO, R. Tea tree oil: a promising essential oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 29, n. 3, p. 201-213, 2017. ZHANG, H.; WANG, Z.; LIU, O. Simultaneous determination of Kolliphor HS15 and Miglyol 812 in microemulsion formulation by ultra-high performance liquid chromatography coupled with nano quality analyte detector. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, [S.l.] v. 6, n.1, p.11-17, 2016.

ZHANG, Y.; ZHANG, X. Y.; CHAI, J. L.; CUI, X. C.; PAN, J.; SONG, J. W.; SUM, B.; LU, J. J. The phase behavior and solubilization of isopropyl myristate in microemulsions containing hexadecyl trimethyl ammonium bromide and sodium dodecyl sulfate. **Journal of Molecular Liquids**, New York, v. 244, p. 262-268, 2017.

ZHANG, S.; ZHANG, M.; FANG, Z.; LIU, Y. Preparation and characterization of blends cloves/cinnamon essential oil nanoemulsions. **LWT - Food Science and Technology**, New York, v. 75, p. 316-322, 2017.

ZHANG, X.; GUO, Y.; GUO, L.; JIANG, H.; JI, Q. Avaliação in vitro da atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. **BioMed research international**, New York, v. 2018, 2018.