



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA *CAMPUS* SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JÚLIO CÉSAR SOUSA PRADO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA
DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides*
Kunth FRENTE A *Candida albicans* NA FORMA PLANCTÔNICA E DE
BIOFILME**

SOBRAL

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P1d PRADO, JÚLIO CÉSAR SOUSA.
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DE NANOEMULSÕES
CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* Kunth FRENTE A *Candida albicans* NA
FORMA PLANCTÔNICA E DE BIOFILME / JÚLIO CÉSAR SOUSA PRADO. – 2023.
123 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde, Sobral, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle.
1. Alginato de Sódio. 2. *Candida albicans*. 3. Estabilidade. 4. Óleo de Girassol. 5. Nanopartículas. I. Título.
CDD 610
-

JÚLIO CÉSAR SOUSA PRADO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA
DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides*
Kunth FRENTE A *Candida albicans* NA FORMA PLANCTÔNICA E DE
BIOFILME**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. Linha de Pesquisa: Biologia Molecular e de Microrganismos. Área de Concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais com Atividade Antimicrobiana.

Orientador: Prof.^a Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle.

SOBRAL

2023

JÚLIO CÉSAR SOUSA PRADO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA
DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia organoides*
Kunth FRENTE A *Candida albicans* NA FORMA PLANCTÔNICA E DE
BIOFILME**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. Linha de Pesquisa: Biologia Molecular e de Microrganismos. Área de Concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais com Atividade Antimicrobiana.

Aprovada em: 05 / 10 / 2023

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle (Orientadora)
Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA

Prof.^a Dra. Flávia Oliveira Monteiro da Silva Abreu – 1º Examinadora
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Prof. Dr. Francisco César Barroso Barbosa – 2º Examinador
Universidade Federal do Ceará – UFC

*Aos meus professores e mestres, que me
deram suporte e apoio ao longo de toda
jornada.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por todo apoio que recebi duramente o mestrado, incluindo recursos humanos, financeiro e materiais.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

A Prof.^a Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle, agradeço pelo apoio, orientação, disponibilidade e pelas oportunidades que me proporcionou durante o curso. Sou muito grato por ter me ajudado a fazer boas escolhas e indicar o melhor caminho.

À Dra. Francisca Lidiane Linhares Aguiar e Dra. Maria Andréa Neves, muito obrigado pelo apoio criterioso e dedicado. Suas contribuições foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco César Barroso Barbosa por ter disponibilizado e auxiliando em seu laboratório para análises.

À Prof.^a Dra. Flávia Oliveira Monteiro da Silva Abreu pelo acolhimento no LAPONAT - UECE, assim como seus integrantes, em especial Joice Farias do Nascimento e Taysse Holanda pelo apoio.

À Prof.^a Dra. Danielle Malta Lima e Prof.^a Dra. Natália Vasconcelos de Souza por todo o apoio e acolhimento enquanto estive no NAMI- UNIFOR.

Às técnicas dos laboratórios da UFC, Flávia de Araújo Silva e Ludmila Gomes Pinheiro (Microbiologia), Rafaela Basto (Imunologia) e Maria José Magalhães Carneiro (Bioquímica), por todo apoio e prontidão a ajudar.

Aos meus bons colegas de bancada laboratorial Guilherme Mendes Prado, Maria Walcleanes Magalhães de Oliveira, Antônia Nádia dos Santos, Carlos Victor Fontenele Pinheiro, Martinair Santana da Silva, Amanda de Lima Barros e Marcelle Melo Magalhães, meus agradecimentos pela amizade e apoio que recebi durante o curso.

Aos ICs integrantes do LABMIC – UVA, em especial Adria Kelvia, Pedro Henrique, Rita Ingrid e Maria Alyce, assim como Mateus Simplício (UFC), meus sinceros agradecimentos, a ajuda de vocês foi essencial para o sucesso deste trabalho.

À minha família e amigos, vocês são minha força. Obrigado pelo apoio e incentivo para sempre ir mais longe.

“A imaginação é mais importante que a Ciência, porque a Ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.” (Albert Einstein)

RESUMO

As infecções fúngicas causadas por *Candida albicans* são um problema global de saúde. Os antifúngicos são utilizados para tratar as infecções causadas por estes fungos, mas esses fungos estão desenvolvendo cada vez mais resistência a esses medicamentos. Nanoemulsões à base de óleos essenciais vegetais são uma nova abordagem promissora para o tratamento de infecções fúngicas. O presente estudo teve como objetivo preparar e caracterizar nanoemulsões de óleo essencial de *Lippia origanoides*, e analisar sua atividade antifúngica contra *C. albicans* na forma planctônica e biofilme, além de verificar sua citotoxicidade. Nanoemulsões de alginato de Sódio foram preparadas em diferentes concentrações de óleo essencial *L. origanoides*, óleo de girassol e surfactante para investigar formulações ideais quanto à sua estabilidade e eficiência antifúngica. Os resultados mostraram que as nanoemulsões foram estáveis por mais de 60 dias, com pH ácido, tamanho de partícula variando de 180 a 500 nanômetros, potencial zeta negativo e índice de polidispersão baixo. As fotomicrografias revelaram que a adição de óleo de girassol ajudou a formar nanoemulsões. As análises de Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR) mostraram a presença do polissacarídeo alginato. Os resultados antifúngicos do óleo essencial e das nanoemulsões mostraram que a CIM variou de 0,078 a 0,312 mg/mL e o CFM variou de 0,156 mg/mL a 0,625 mg/mL. A nanoemulsão foi mais eficaz que o óleo essencial livre na erradicação do biofilme, eliminando até 89,7% de sua massa. No entanto, as nanoemulsões também foram consideradas mais citotóxicas. Em conclusão, as nanoemulsões de alginato contendo óleo essencial de *L. origanoides* são uma abordagem promissora para o tratamento de infecções fúngicas por *C. albicans*.

Palavras-chave: Alginato de Sódio; *Candida albicans*; Estabilidade; Óleo de Girassol; Nanopartículas.

ABSTRACT

Fungal infections caused by *Candida albicans* are a global health problem. Antifungals are used to treat infections caused by these fungi, but these fungi are increasingly developing resistance to these medications. Nanoemulsions based on plant essential oils are a promising new approach for treating fungal infections. The present study aimed to prepare and characterize nanoemulsions of *Lippia organoides* essential oil, and analyze their antifungal activity against *C. albicans* in planktonic and biofilm form, in addition to verifying their cytotoxicity. Sodium alginate nanoemulsions were prepared in different concentrations of essential oil, sunflower oil and surfactant to investigate ideal formulations regarding their stability and antifungal efficiency. The results showed that the nanoemulsions were stable for more than 60 days, with acidic pH, particle size ranging from 180 to 500 nanometers, negative zeta potential and low polydispersity index. Photomicrographs revealed that the addition of sunflower oil helped form nanoemulsions. Infrared Spectroscopy (FT-IR) analyzes showed the presence of the polysaccharide alginate. The antifungal results of the essential oil and nanoemulsions showed the MIC ranged from 0.078 to 0.312 mg/mL and the CFM ranged from 0.625 mg/mL. The nanoemulsion was more effective than the free essential oil in eradicating the biofilm, eliminating up to 89.7% of its mass. However, nanoemulsions were also found to be more cytotoxic. In conclusion, alginate nanoemulsions containing *L. organoides* essential oil are a promising approach for the treatment of *C. albicans* fungal infections.

Keywords: Sodium Alginate; *Candida albicans*; Stability; Sunflower Oil; Nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS
REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 -	<i>Lippia origanoides</i> Kunth.....	19
Figura 2 -	Estrutura química do Timol.....	19
Figura 3 -	Nanopartículas ou nanocarreadores lipídicos de substâncias bioativas.....	21
Figura 4 -	Esquematização representativa de nanoemulsão de óleo em água.....	22
Figura 5 -	Sistemas nanoemulsionado e microemulsionado.....	23
Figura 6 -	Esquematização representativa da desestabilização de nanoemulsão.....	24
Figura 7 -	Estrutura do alginato de sódio, matriz polimérica.....	25
Figura 8 -	A- <i>Candida albicans</i> na forma leveduriforme; B- Desenvolvimento de hifas filamentosas em <i>Candida albicans</i>	28
Figura 9 -	Fases da Formação do biofilme de <i>Candida albicans</i>	29

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO DE REVISÃO

Figura 1 - Nanoemulsions and the behavior against the different diameters of their particles.....	36
Figura 2 - Representative schematic of oil-in-water nanoemulsion.....	37
Figura 3 - Representative schematic of nanoemulsion instability.....	38
Figura 4 - Scheme of delivery of nanoemulsion nanoparticles to the microbial cell membrane.....	49

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO DE EXPERIMENTAL

Figura 1 -	Análise dos parâmetros de estabilidade ((A) formação de creaming; (B) formação de sedimento; (C) Ph; (D) viscosidade relativa das nanoemulsões	70
Figura 2 -	Análise de microscopia óptica das amostras: (A) NE_5GE; e (B) NE_5R.....	72
Figura 3 -	Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície de nanoemulsões de alginato com óleo essencial de <i>L. origanoides</i> na concentração de 5 mg/mL com (NE_5GE) e sem (NE_5R) presença do óleo vegetal. A) NE_5GE com aumento de 10.000x. B) NE_5R com aumento de 10.000x. C) NE_5GE com aumento de 20,000X. D) NE_5R com aumento de 2,000x.....	74
Figura 4 -	FTIR spectra of alginate, NE_5GE and NE_5R.....	75
Figura 5	Efeito do óleo essencial e nanoemulsões de <i>L. origanoide</i> contra biofilme de <i>C. albicans</i> de adesão.....	78
Figura 6	Efeito do óleo essencial e nanoemulsões de <i>L. origanoides</i> contra biofilme madura de <i>C. albicans</i>	78
Figura 7	Atividade de citotoxicidade do óleo essencial e nanoemulsões de <i>L. origanoides</i>	79

LISTA DE TABELA

ARTIGO DE REVISÃO

Tabela 1 - Nanoemulsions produced from different plant extracts with antibacterial, antifungal and antiviral properties, in addition to presenting the dispersant medium, surfactant, particle size and the potentiated effect of nanoemulsions.....	39
--	----

ARTIGO DE EXPERIMENTAL

Tabela 1 - Condições experimentais de produção de nanoemulsões de alginato com óleo essencial de <i>L. origanoides</i>	65
Tabela 2 Composição química do óleo essencial de <i>L. origanoides</i>	69
Tabela 3 Tamanho de Partícula, Potencial Zeta e Índice de Polidispersão de nanoemulsões produzidas	72
Tabela 4 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima de Nanoemulsões e Óleo Essencial de <i>L. origanoides</i> contra <i>Candida albicans</i>	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
CE	Ceará
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa
LABMIC	Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú
DMSO	Dimetilsulfóxido
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Il)-2,5-Difeniltetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
BHI	<i>Bran Heart Infusion Broth</i>
SDS	Dodecilsulfato De Sódio
spp	Espécie
UFC	Universidade Federal do Ceará
PNPMF	Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
SUS	Sistema Único de Saúde
O/A	Óleo em Água
A/O	Água em Óleo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
USA	Estados Unidos da América

LISTA DE SIMBOLOS

°C	Graus Célsius
μL	Microlitro
μM	Micrometro
cm	Centímetro
IR	Índice de Retenção
mL	Mililitro
nM	Nanômetro
UFC	Unidades Formadora de Colônia
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem
M	Metro
B	Beta
Mm	Milímetro
Mg	Miligrama
η	Viscosidade relativa
®	Marca registrada
>	Maior que
<	Menor que
=	Igual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Plantas medicinais.....	17
2.2	<i>Lippia origanoides</i> Kunth.....	18
2.3	Nanopartículas.....	20
2.4	Nanoemulsão.....	21
2.5	Matrix polissacarídica (Alginato de sódio)	25
2.6	<i>Candida</i> spp.....	26
2.7	<i>Candida albicans</i>.....	27
2.8	Biofilme de <i>C. albicans</i>.....	29
3	OBJETIVO.....	31
3.1	Objetivo geral.....	31
3.2	Objetivos específicos.....	31
4	ARTIGOS.....	32
4.1	Artigo de Revisão.....	32
4.2	Artigo Experimental.....	60
5	CONCLUSÃO.....	86
	REFERÊNCIAS.....	86
	ANEXO A – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>L. origanoides</i>.....	97
	ANEXO B – LEITURAS DO TAMANHO DE PARTÍCULAS DAS NANOEMULSÕES.....	98
	ANEXO C – LEITURA DO POTENCIAL ZETA DAS NANOEMULSÕES.....	104
	ANEXO D – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA DAS	

NANOEMULSÕES.....	110
ANEXO E – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA DAS NANOEMULSÕES DE <i>L. origanoides</i> FRENTE À <i>Candida albicans</i>	118

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são fontes de princípios ativos com propriedades terapêuticas, sendo amplamente utilizadas por populações que não têm acesso aos medicamentos convencionais para tratamento e cura de doenças (RAFIEIAN-KOPAEI, 2012; MALIK *et al.*, 2022). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial já fez uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica (FIRMO *et al.*, 2011). No Brasil, dados do Ministério da Saúde (2017) revelam que as plantas medicinais estão inseridas no Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos - PNPMF, que objetiva o acesso da população brasileira ao uso seguro e racional de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades, onde até o final de 2016, mais de três mil unidades de saúde, de 900 municípios, ofertavam produtos fitoterápicos no Sistema Único de Saúde - SUS.

É pertinente destacar que o Brasil representa a flora mais rica do mundo, onde essa diversidade de plantas representa um grande potencial para a descoberta de novos fármacos, apesar do pouco investimento e atenção que é dada ao assunto, existe um grande potencial na prospecção de plantas com ação farmacológica, onde é necessário aprofundar o conhecimento sobre as propriedades da abundante flora brasileira (SIMÕES; SCHENKEL, 2002; BARREIRO; BOLZANI, 2009; JACOB; ALBUQUERQUE, 2021). Nesse entendimento, as plantas se tornaram materiais de exploração de potenciais bioativos, principalmente pelo baixo custo de cultivo que às tornaram relevantes fontes de pesquisa na área química, fisiológica, farmacológica e microbiológica, levando sua aplicação no campo medicinal (ARORA *et al.*, 2013; ALAO *et al.*, 2022).

Dentre as plantas medicinais consolidadas na cultura popular brasileira, a espécie *Lippia organoides* Kunth se destaca por apresentar-se como fonte de princípios ativos com propriedades profiláticas e terapêuticas já conhecidas (GUIMARÃES *et al.*, 2015). Entre seus efeitos biológicos já relatados na literatura, destaca-se sua atividade antimicrobiana (FONTENELLE *et al.*, 2007; FREIRES *et al.*, 2015), anti-helmíntica (CARVALHO *et al.*, 2012), larvicida (LIMA *et al.*, 2013), antioxidante (NONATO *et al.*, 2022), antigenotóxica (BRAGA *et al.*, 2019) e antiviral (MENESES *et al.*, 2009).

A associação de nanoemulsões com bioativos oriundos de plantas medicinais buscam superar problemáticas próprias dessas substâncias atreladas a baixa instabilidade, toxicidade do solvente e a baixa solubilidade desses compostos

(ANSARI; ISLAM; SAMEEM, 2012). Tais estruturas funcionam como nanocarreadores dessas substâncias naturais e que têm se mostrado excelente ferramenta de entrega em sítios específicos (APOLINÁRIO *et al.*, 2020; DAMODHARAN, 2021).

Portanto, as nanoemulsões se apresenta como uma alternativa para síntese, caracterização, produção e aplicação de partículas em escala nanométrica, os quais podem ser úteis na preservação das características originais de produtos naturais provenientes de plantas medicinais (AHMED; NABAVI; BEHZAD, 2021). Dentre as técnicas de formação de nanopartículas, o nanoencapsulamento se destaca, pois tem sido empregado para melhorar as características dos ingredientes ativos quanto à solubilidade em água, forma de armazenamento e estabilidade térmica, com possibilidade de liberação controlada em concentrações reduzidas (PRAKASH *et al.*, 2018).

A busca por produtos alternativos na medicina convencional está associada aos seus efeitos colaterais, por ser ineficientes ou por seu alto custo (KIM *et al.*, 2016). Diante disto, os nanoproductos produzidos a partir de produtos naturais tornam-se uma alternativa de cura frente a doenças, sobretudo das infecções hospitalares que se manifestam durante a internação ou após alta do paciente (RAJ *et al.*, 2020). Pela sua gravidade e aumento do tempo de internação, é causa de morbidade e mortalidade, caracterizando-se como um problema de saúde pública (TURRINI, 2002).

Entre as infecções fúngicas a candidíase se sobressai, apresentando como agente de causa os fungos do gênero *Candida* spp. que são responsáveis por cerca de 80% das infecções fúngicas no ambiente hospitalar e que constitui causa relevante de infecções da corrente sanguínea (SENDID *et al.*, 2002). Dentre os fungos deste gênero, *Candida albicans* se destaca devido sua alta prevalência em infecções hospitalares, apesar de fazer parte da microbiota humana. Uma vez rompido o equilíbrio biológico entre a microbiota e o organismo hospedeiro, a espécie tem a capacidade de provocar infecções, ocasionando quadros agudos, subagudos ou crônicos, superficiais ou profundos, onde tal fato está relacionado aos fatores de virulência que o microrganismo carrega em seu gene (CALDERONE; FONZI, 2001; NAVES *et al.*, 2010).

Dessa forma, o presente estudo visa produzir nanoemulsões em diferentes concentrações do óleo essencial da planta *L. origanoides* e analisar o potencial antifúngico contra cepas clínicas de *C. albicans* na sua forma planctônica e biofilme. Onde serão avaliadas as concentrações de cada componente da formulação, bem como

as condições de emulsificação para otimização do processo de obtenção das nanopartículas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

O uso de plantas para tratar e curar doenças data desde os tempos antigos, onde tal prática ainda é difundida na cultura popular (ARGENTA *et al.*, 2011; HEINRICH *et al.*, 2017). As plantas são classificadas como medicinais quando apresentam ação farmacológica, onde tal fato está associado com substâncias relacionadas ao metabolismo secundário, que confere a elas defesa e proteção contra predadores e agentes patogênicos (CASANOVA; COSTA, 2017; SÁ-FILHO *et al.*, 2021). Dentre tais compostos, destacam-se os alcalóides, flavonóides, taninos e óleos essenciais (MENEZES *et al.*, 2021).

Os metabólitos secundários vegetais se destacam devido seus efeitos biológicos, os fitoesteróis por exemplo são responsáveis pela redução da absorção do colesterol na dieta, com conseqüente redução nos níveis sanguíneos o que reduz o risco de doenças cardiovasculares (LOTTENBERG *et al.*, 2002). Já a classe dos flavonóides que têm como representantes as antocianinas, flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavononas e flavanas, possuem uma estreita relação com ação antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (NIJVELDT *et al.*, 2001; PEREIRA; CARDOSO, 2012). Os terpenos são representados pelas classes dos monoterpenos, sequiterpenos, diterpenos, triterpenos e os tetraterpenos, os monoterpenos em específicos costumam ser substâncias voláteis sendo, portanto, denominados de óleos essenciais e que encontram considerável aplicação na indústria, além de fortes evidências de sua ação antimicrobiana, antiviral e inseticida (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Nesse entendimento é importante salientar que o Brasil detém a flora mais rica do mundo, com cerca de 56.000 espécies de plantas já catalogadas de um total estimado de 550.000, que representa quase 19% do total da flora mundial (GIULIETTI *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2015; FELICIANO; MUCHON; ALMEIDA, 2022). Apesar que apenas 8% das espécies vegetais brasileiras foram estudadas em busca de compostos ativos e apenas 1.100 espécies foram avaliadas quanto suas propriedades medicinais (HEINZMANN; BARROS, 2007).

As plantas medicinais no Brasil são regulamentadas pela ANVISA, órgão responsável por proteger e promover a saúde da população, garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços, assim como seu acesso. Nessa perspectiva o Estado brasileiro instituiu através da Portaria nº 22/1967 e a Resolução nº 17/2000 que classifica as plantas medicinais como medicamentos. Em 2006 foi aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos – PNPMF, através do Decreto nº 5.813, no qual estabelece diretrizes relacionadas as plantas medicinais e fitoterápicos voltados à garantia do acesso seguro e uso racional, ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como ao fortalecimento produtivo, ao uso sustentável da biodiversidade brasileira (KIRCHNER *et al.*, 2022; SARAIVA *et al.*, 2015).

Dentre as plantas com potencial medicinal e com fortes evidências científicas quanto sua ação biológica, destacam-se *Allium sativum* L. (BORRELLI; CAPASSO; IZZO, 2007), *Aloe vera* L. (SAHU *et al.*, 2013), *Syzygium aromaticum* L. (VICIDOMINI; ROVIELLO; ROVIELLO, 2021), *Lippia origanoides* Kunth (BOTELHO *et al.*, 2007; FONTENELLE *et al.*, 2007), *Lippia alba* (PASCUAL *et al.*, 2001), *Plectranthus amboinicus* (Lour) (CHANG *et al.*, 2010), *Matricaria chamomilla* L. (HEIDARI; ASADIPOUR; GHAYOUR, 2002), *Cinnamomum zeylanicum* Breyne (RANASINGHE *et al.*, 2013; MOTA; DANTAS. FROTA, 2018).

2.2 *Lippia origanoides* Kunth.

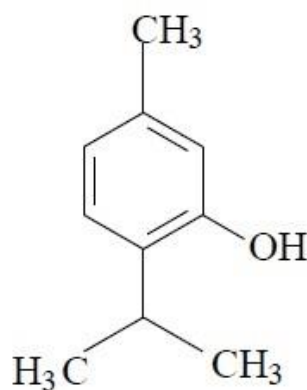
Lippia origanoides Kunth. (Figura 1) pertencente à família Verbenaceae, é conhecida popularmente como alecrim-pimenta e característica da vegetação do Nordeste brasileiro, apesar de também ser encontrada em outras regiões do país como em países da América Latina (SIQUEIRA *et al.*, 2011; ROCHA *et al.*, 2022). Apresenta-se na forma de arbusto com 0,4-2,5 m de altura, ramificada, com folhas pecioladas e lâminas elípticas, oblongas e ovadas, com consistência cartácea, possuem inflorescência na forma tetragonal e flores no formato de cálices tubulosos (DURIGAN *et al.*, 2018).

Figura 1 – *Lippia origanoides* Kunth

Fonte: Adaptado de Flora do Brasil (2020).

O óleo essencial das folhas de *L. origanoides* geralmente é rico em timol ($C_{10}H_{14}O$) (Figura 2), moléculas pertencentes ao grupo dos monoterpenos e que possuem uma estreita relação com ação antimicrobiana (BRITO *et al.*, 2015). O timol também conhecido como 2-isopropil-5-metilfenol é isômero do carvacrol, pode ser extraído como uma substância aromática, de coloração cristalina branca e odor agradável, pouco solúvel em água sendo extremamente solúvel em alguns solventes orgânicos, apresenta *pH* neutro e possui características alcalinas em soluções aquosas, devido à desprotonação do fenol (MINA *et al.*, 2010; LOBO *et al.*, 2011).

Figura 2 – Estrutura química do Timol



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

A espécie se torna importante para a comunidade por apresentar estreita relação com amplo espectro de atividades biológicas relevantes, como seu efeito antinociceptivo (MARÇAL *et al.*, 2006), anti-inflamatório (MONTEIRO *et al.*, 2007), antioxidante (ZANOTTO *et al.*, 2023), antidepressivo (PARENTE *et al.*, 2018) e neuroprotetor (BARBOSA *et al.*, 2017), assim como atividade antimicrobiana (ASSIS *et al.*, 2021; FELIX E SILVA *et al.*, 2022), antifúngica (TARIQ *et al.*, 2019; BALDIM *et al.*, 2019), antivirais (WANI *et al.*, 2021), antileishmaniose (MEDEIROS *et al.*, 2011) e acaricida (CAVALCANTI *et al.*, 2010).

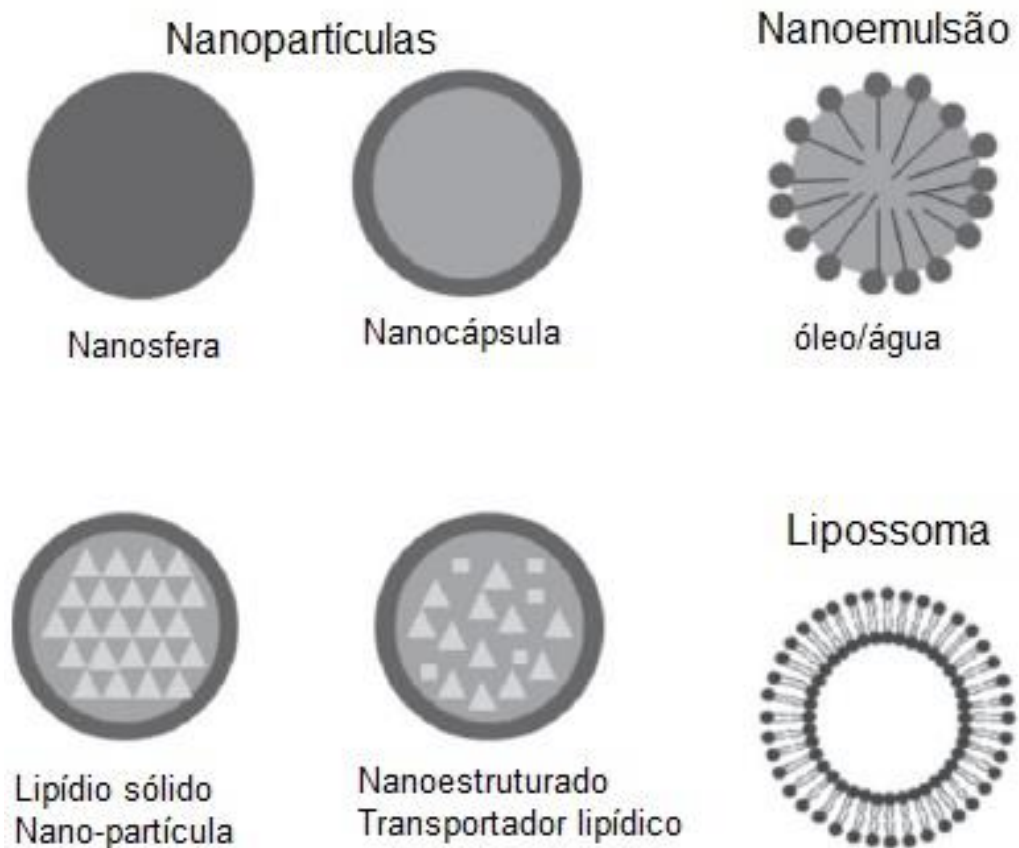
Além das finalidades citadas, diversos ensaios *in vitro* permitiram constatar o potencial antimicrobiano de *L. origanoides*, sendo alguns desses microrganismos bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* (CASTRO *et al.*, 2011), *Streptococcus mutans* (LOBO *et al.*, 2014), *Enterococcus faecalis* (ARRUDA *et al.*, 2007), *Listeria monocytogenes* (REIS *et al.*, 2011), *Clostridium perfringens* (COLES *et al.*, 2021), *Bacillus subtilis* (OLIVEIRA *et al.*, 2018)), gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* (SIQUEIRA *et al.*, 2011; VERAS *et al.*, 2017; PINHEIRO, 2021), *Aeromonas hydrophila* (PIRES *et al.*, 2021)), fungos dermatófitos (*Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* (FONTENELLE *et al.*, 2007)), fungos leveduriformes (*Candida* spp. (FONTENELLE *et al.*, 2007; FARIAS *et al.*, 2012; FRANCIMAT *et al.*, 2021), *Cryptococcus neoformans* (FUNARI *et al.*, 2012), *Malassezia furfur* (SIQUEIRA *et al.*, 2011)) e vírus (HSV 2 – Vírus da Herpes Simples tipo 2) (BOURNE *et al.*, 1999).

É importante salientar que estudos relatam que o timol geralmente apresenta baixa toxicidade aguda em células de mamíferos, representando como alternativas promissoras na aplicação de tratamento no ambiente clínico (SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015; FERNANDES, 2017).

2.3 Nanopartículas

A busca por elevar a eficácia de drogas e compostos biotivos dentro da medicina têm se tornado relevante, onde nanopartículas ou nanocarreadores lipídicos (Figura 4) vêm mostrando excelentes resultados quanto a eficiência de transporte e entrega dessas substâncias medicinais, além de evitar a degradação prematura e tornar a liberação controlada (ZHANG *et al.*, 2018).

Figura 3 - Nanopartículas ou nanocarreadores lipídicos de substâncias bioativas



Fonte: Adaptado de Zorzi *et al.*, 2015

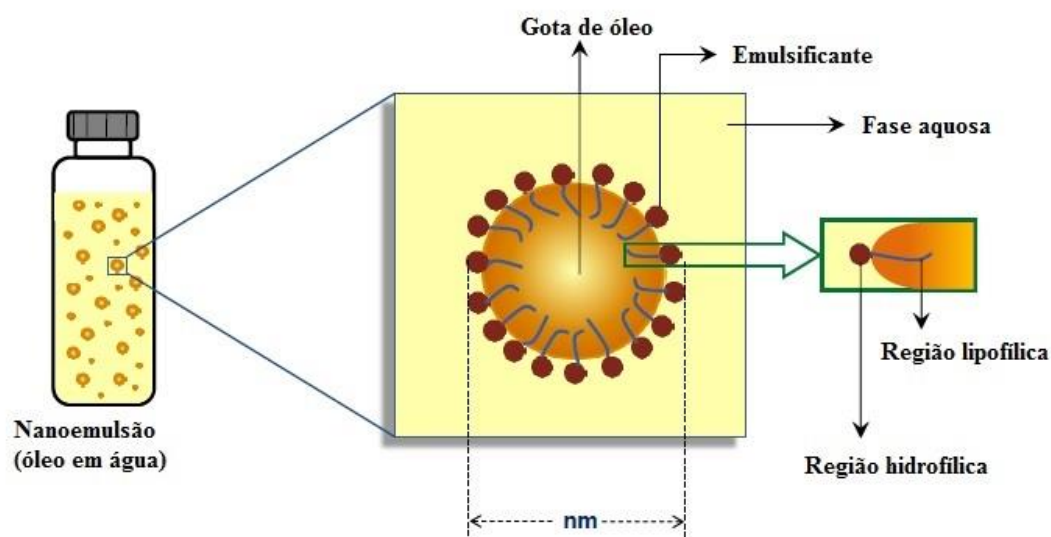
As nanopartículas possuem em comum seu tamanho, que deverão apresentar-se inferiores a 1000 nm (KHANBEIGI *et al.*, 2012). Cada sistema apresenta suas particularidades, enquanto as nanopartículas são adequadas para o carregamento de substâncias sólidas, as nanoemulsões são indicadas para o transporte de substâncias líquidas (ASSIS *et al.*, 2012).

Algumas nanoformulações têm encontrado sucesso na entrega de fármacos utilizados no combate a bactérias, fungos e protozoários, sendo relevante no combate a doenças induzidas em animais como salmonelose, brucelose, tuberculose, candidíase e leishmaniose (COLA *et al.*, 2016). Singh *et al.* (2014), relatam em seus estudos o potencial nanopartículas de vancomicina em matriz polimérica de quitosana, utilizada como nanocarreadora desta droga para células bacterianas resistentes a forma tradicional que é administrada, isto mostra o quanto é promissor a aplicação dessas nanoestruturas no combate a microrganismos resistentes.

2.4 Nanoemulsão

São sistemas heterogêneos que apresentam partículas submicrômicas e que estão em ascensão em pesquisas para entrega sistêmica de agentes biologicamente ativos com direcionamento controlado, além de fornecer características físico-químicas melhoradas e uma maior estabilidade (FAROKHZAD, 2009; SHAH; BHALODIA; SHELAT, 2010; SINGH *et al.*, 2017). As nanoemulsões de forma geral são formadas de óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), onde dependem de um agente emulsionante para atingir tal consistência por um maior tempo (CODEVILLA *et al.*, 2015). A figura 5 representa a esquematização de um sistema nanoemulsionado de O/A com a estruturação de cada componente, onde é possível observar a fase aquosa, fase oleosa e o agente emulsificante.

Figura 4 - Esquematização representativa de nanoemulsão de óleo em água.



Fonte: Adaptado de Karthik *et al.*, 2015

Os agentes emulsificantes ou tensoativos são surfactantes fundamentais para impedir a agregação das nanopartículas formadas, mesmo após o armazenamento prolongado, sendo responsáveis por promoverem a estabilidade físico-química da nanoemulsão (SURASSMO *et al.*, 2010). É importante salientar que os surfactantes são substâncias anfifílicas e que possuem uma região polar (hidrofílica) e outra apolar (lipofílica), característica ideal para a formação das nanopartículas de O/A ou A/O (BOTELHO *et al.*, 2018).

Esses sistemas ainda podem ser caracterizados como nanoemulsão ou microemulsão (Figura 6), a depender do tamanho das partículas formadas no meio. Os sistemas nanoemulsionados normalmente apresentam partículas com dimensões de 10 a

100 nm, e que visualmente tem aspecto translúcido, já as microemulsões têm aspecto leitoso e opaco, cujo os diâmetros médios das partículas são superiores a 100 nm (MCCLEMENTS, 2012; PEY *et al.*, 2019).

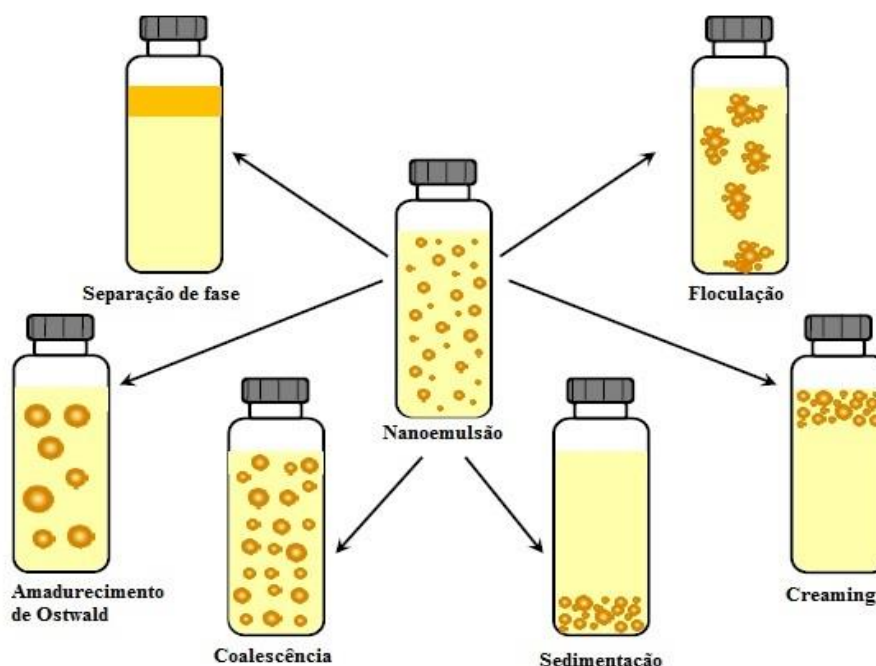
Figura 5 - Sistemas nanoemulsionado e microemulsionado



Fonte: Solans *et al.*, 2005.

As nanoemulsões apresentam uma maior estabilidade das nanopartículas suspensas quando se compara as microemulsões, onde aparência destes sistemas estão fortemente relacionadas ao tamanho das partículas formadas (WEISS *et al.*, 2009). A desestabilização física das emulsões está relacionada com a tendência espontânea para o espaço mínimo interfacial entre as suas fases imiscíveis (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008). A figura 6 expõe os possíveis tipos de instabilidade físico-química relacionados a sistemas emulsionados.

Figura 6 - Esquemática representativa da desestabilização de nanoemulsão



Fonte: Adaptado de Costa *et al.*, 2019.

Dentre os processos de desestabilização, destaca-se a formação de *creaming* que está mais propenso em ocorrer em nanoemulsão de O/A, enquanto a sedimentação é mais predominante em nanoemulsões de A/O (ZHANG; MCCLEMENTS, 2018). O *creaming* ou cremeação é a formação de uma camada cremosa na superfície da emulsão, ocorre devido a diferença de densidade dos componentes da nanoemulsão e pela presença de forças externas ao sistema como, a força gravitacional e centrífuga (REDDY; MELIK; FOGLER, 1981; RABINOVICH *et al.*, 2004). Na sedimentação, assim como no *creaming*, ocorre devidamente a diferença de densidade dos materiais e a sua baixa solubilidade em meio aquoso (TADROS, 2006).

A coalescência, a floculação e o amadurecimento de Ostwald ocorrem devido a solubilização parcial da fase oleosa na fase aquosa, assim ocorre a formação de gotículas oleosas maiores dispersas no sistema o que pode acarretar a separação total das fases. A floculação ainda pode ser entendida como a agregação entre as gotículas oleosas, que conseqüentemente pode levar a formação de gotículas maiores, assim caracterizando-se como coalescência. Já o amadurecimento de Ostwald consiste no crescimento do raio da gotícula e na diminuição do número total das gotículas dispersas do sistema (TADROS, 1996; FRANZOL; REZENDE, 2015).

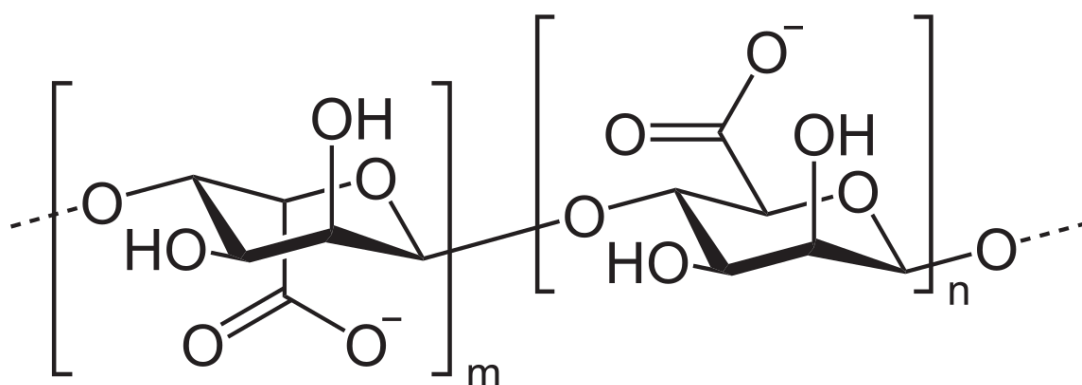
Além dos processos de desestabilização citados, parâmetros como viscosidade, *pH* e a análise em microscópio óptico auxiliam na caracterização da

estabilidade de um sistema nanoemulsionado (NASCIMENTO; COSTA; ABREU, 2020). A viscosidade possui relação com o diâmetro das gotículas formadas, onde os menores valores da viscosidade podem ser associados aos menores tamanhos de gotículas, assim evitando os processos de desestabilização (DUAN *et al.*, 2011). O *pH* é um importante parâmetro de monitoramento da estabilidade, pois a alteração do seu valor sugere a ocorrência de reações químicas que podem comprometer a qualidade final do produto (MARTINI, 2005). Já a microscopia óptica revela aspectos como os tamanhos, o formato e o modo de dispersão das gotículas dentro do sistema, características que podem revelar a estabilidade do sistema (SIQUEIRA, 2017).

2.5 Matriz polissacarídica (Alginato de Sódio)

O alginato de sódio é um polissacarídeo natural derivado de algas marinhas. É um biopolímero linear formado por unidades de ácido algínico, que são unidades de poli- β - D - manurato e poli - α - L - guluronato (SACHAN *et al.*, 2009). Seu arranjo é dado pela relação característica de monômeros de manurônico e gulorônico (M/G), que é representado pela figura 7. Essa relação varia dependendo da fonte do polissacarídeo.

Figura 7 - Estrutura do alginato de Sódio, matriz polimérica



Fonte: GAO *et al.*, 2009.

O alginato de sódio é um material biocompatível e biodegradável, o que o torna um candidato ideal para uma variedade de aplicações, incluindo a produção de nanoemulsões. As nanoemulsão são sistemas coloidais que consistem em duas fases imiscíveis, uma aquosa e uma fase oleosa, dispersas em uma escala nanométrica

(YANG *et al.*, 2022). Elas são frequentemente usadas em aplicações farmacêuticas, cosméticas e alimentícias.

Esse polissacarídeo é um agente emulsificante eficaz porque é capaz de formar filmes finos e flexíveis em torno das gotículas de óleo. Esses filmes atuam como uma barreira que impede a separação das fases aquosas e oleosas. Além de suas propriedades emulsificantes, o alginato de sódio também pode fornecer outras propriedades benéficas às nanomeulsões, como estabilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (LEE; MOONEY, 2012). Sua biocompatibilidade o faz um material biocompatível, o que o torna seguro para usos em aplicações farmacêuticas e cosméticas. A biodegradabilidade o torna material biodegradável, que o faz seguro quanto sua eliminação do corpo de forma natural. Além de ajudar a estabilizar as nanoemulsões, tomando-as menos propensas à separação (FRANK *et al.*, 2018).

2.6 *Candida* spp.

O gênero *Candida* está inserido taxonomicamente no reino Fungi, filo Ascomycota, classe Saccharomycetes e família Saccharomycetaceae (SILVA, 2015). No que concerne a aspectos morfológicos, este fungo é considerado polimórfico, podendo se apresentar como levedura ovoide (blastoconídeo) com cerca de 3 a 5 μm , ou mesmo, como pseudo-hifas e hifas filamentosas (BARBEDO; SGARBI, 2010). Possuem uma estrutura celular composta por uma parede celular rica em quitina, polissacarídeos de glicose e polímeros de manose ligados de maneira covalente a manoproteínas, seguido de uma membrana fosfolipídica constituída por proteínas, que agem como enzimas, e ergosterol (ROCHA *et al.*, 2021).

Sabe-se que as leveduras desse gênero podem estar presentes na microbiota normal de indivíduos saudáveis, colonizando principalmente, o trato gastrointestinal, a cavidade oral, a pele e a mucosa geniturinária (OLIVER *et al.*, 2019). No entanto, quaisquer alterações no sistema imunológico do hospedeiro podem acarretar em disbiose, e conseqüentemente, em manifestações clínicas mais agressivas. Desse modo, este gênero é formado por leveduras oportunistas, acometendo de maneira direta, aqueles indivíduos imunocomprometidos, bem como, aqueles que fazem uso de antibacterianos de amplo espectro (PAPPAS *et al.*, 2018).

Como uma das infecções mais associadas a esses patógenos, a candidíase como é conhecida, afeta cerca de 250.000 pessoas por ano em todo o mundo, com

variadas manifestações clínicas dependente da resposta imunológica do paciente (CLEVELAND *et al.*, 2015). Desse modo, as infecções ocasionadas por microrganismos do gênero *Candida* podem variar desde superficiais, leves até mesmo infecções invasivas de difícil tratamento (DADAR *et al.*, 2018). No caso das infecções superficiais, são relatadas aquelas cutâneas de fácil tratamento, como a candidíase oral e vulvovaginal (RODRIGUES *et al.*, 2013). No que se refere a infecção invasiva, esta é decorrente da disseminação do microrganismo pela corrente sanguínea (candidemia), sendo verificado a alta capacidade de adaptação da levedura aos diferentes nichos do hospedeiro (ROSCETTO *et al.*, 2018). De fato, a candidemia está diretamente associada a utilização de implantes médicos, como próteses, stendes, tubos endotraqueais, dentre outros (PAPPAS *et al.*, 2018).

Dentre as espécies desse gênero, *Candida albicans* tem se destacado, tornando-se a espécie mais estudada devido a frequência em que é isolada de sítios de infecção, todavia, devido a utilização indiscriminada de antifúngicos aliado a baixa atividade fungicida, outras espécies não-*albicans* têm sido descritas (SALCI *et al.*, 2018). Espécies como *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* estão sendo cada vez mais isoladas em sítios de infecção, apresentando fenótipos de resistência aos principais antifúngicos. Além dessas, nos últimos anos foi observado o surgimento de outra espécie multirresistente, *C. auris*, descrita em diversos países inclusive no Brasil (ZAMITH-MIRANDA, 2021).

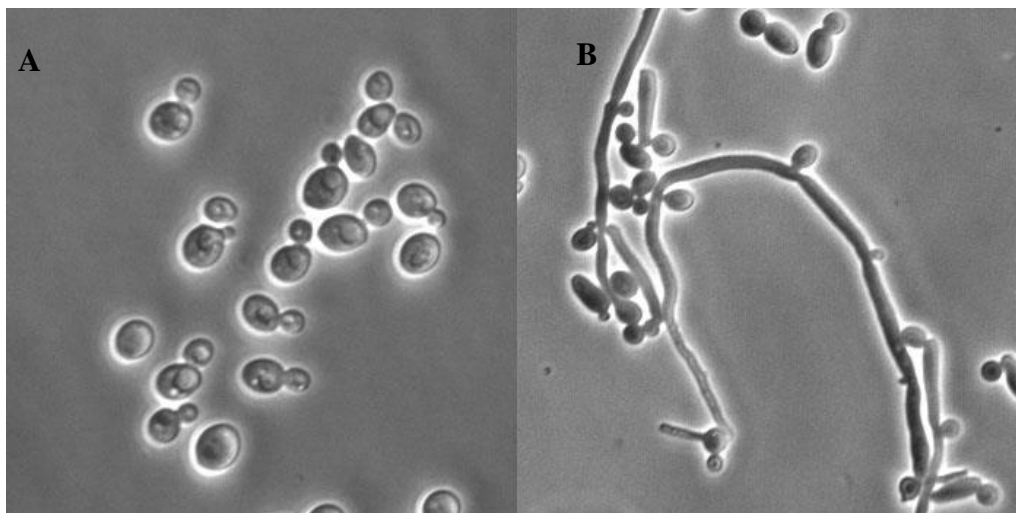
Nessa perspectiva, tendo em vista as inúmeras espécies patogênicas presentes nesse gênero, é de grande relevância a correta identificação do microrganismo, visando conhecer seus fatores de virulência associados a infecção em questão e o perfil de sensibilidade, garantindo assim, as melhores escolhas para a terapia antifúngica.

2.7 *Candida albicans*

Candida albicans tem sido relatada como um dos patógenos fúngicos mais prevalentes em seres humanos, acometendo indivíduos em todo o mundo, seja a partir de infecções endógenas ou exógenas. Essa espécie possui a capacidade de colonizar diversos nichos, possuindo uma alta resistência ao ambiente externo, além de sobreviver com certas variabilidades de nutrientes, níveis de CO₂ e pH (WITCHLEY *et al.*, 2019). Outra característica dessa espécie, é a sua capacidade de transitar entre a forma leveduriforme, para pseudo hifas e hifas filamentosas, de acordo com as condições

ambientais em que está inserida, se tornando um mecanismo de adaptação para sobrevivência (Figura 8) (CHEN *et al.*, 2020).

Figura 8 – A - *Candida albicans* na forma leveduriforme; B - Desenvolvimento de hifas filamentosas em *Candida albicans*



Fonte: Wouda-van der Tuin, 2016.

Em relação aos aspectos moleculares, *C. albicans* apresenta uma significativa diversidade genética e fenotípica, contribuindo para o seu perfil infeccioso (POULAIN, 2013). Ademais, estudos apontam uma instabilidade genética nessa espécie, sendo capaz de modular o comportamento frente ao hospedeiro, como por exemplo, a resistência a alguns fatores imunológicos, a morfologia e o perfil de crescimento (BRAUNSDORF, GUT-LANDMANN, 2018).

Dentre as espécies do gênero *Candida*, *C. albicans* se destaca por apresentar diversos fatores de virulência que auxiliam na entrada do microrganismo no hospedeiro, bem como, seu estabelecimento nos sítios de infecção, tais como a transição morfológica, a expressão de algumas moléculas que auxiliam na adesão a substratos, secreção de enzimas hidrolíticas, trigmotropismo, formação de biofilmes, dentre outras características (MAYER; HUBE; WILSON, 2013).

Tais fatores suportam a prevalência dessa espécie em ambientes hospitalares, sendo o principal patógeno dentro do gênero *Candida*, a ser isolado de hemoculturas (LAMOTH *et al.*, 2018). Infecções nosocomiais por *C. albicans* está intimamente relacionado a utilização de antimicrobianos, corticoides, quimioterapia, neoplasias hematológicas, cirurgia gastrointestinal. Além da infecção cruzada já ter sido

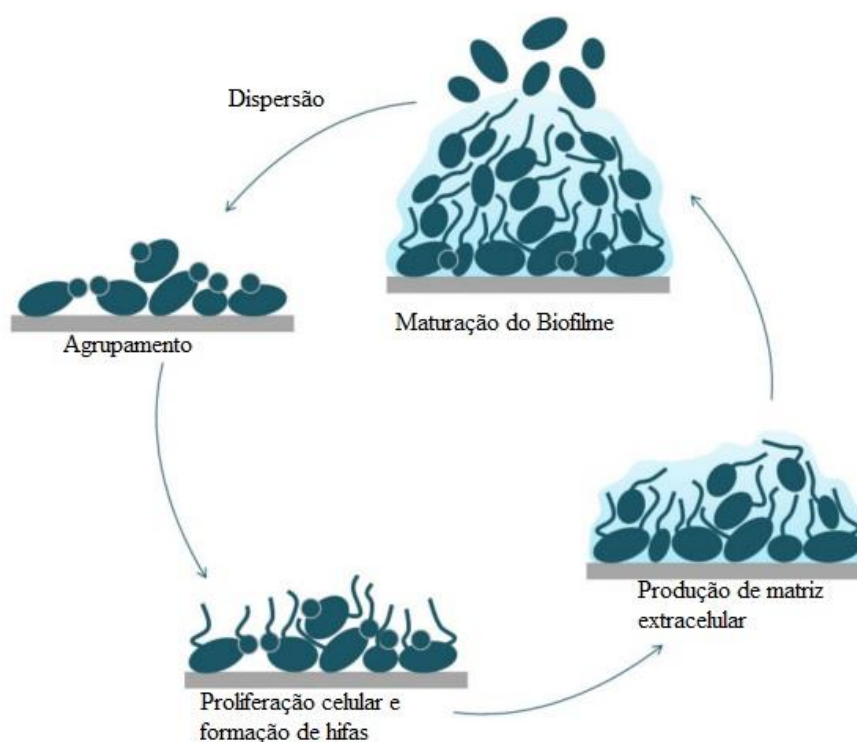
relatada a partir das mãos dos profissionais e superfícies em ambientes de UTIs (ARITA *et al.*, 2019).

No entanto, este microrganismo também está associado a infecções envolvendo indivíduos imunocomprometidos, dentre as quais, infecção oral pseudomembranosa, candidíase eritematosa, candidíase hiperplásica, queilite angular, candidíase muco cutânea crônica, candidíase vaginal, além do acometimento de alguns órgãos, como rins, fígado, baço e cérebro (ROSSI *et al.*, 2011; OLIVEIRA, 2012). Desse modo, *C. albicans* se torna o microrganismo modelo para estudos envolvendo o gênero *Candida*.

2.8 Biofilme de *C. albicans*

A formação de biofilmes é uma das estratégias mais importantes de sobrevivência de *C. albicans*, se tornando capaz de aderir a superfícies bióticas e abióticas e formar aglomerados resistentes. Estes aglomerados possuem grande organização, totalmente distinto a forma de vida planctônica, com proteção atribuída a camada de matriz exopolissacarídica que envolve todo o biofilme (ALIM; SIRCAIK; PANWAR, 2018). É de conhecimento que a formação do biofilme envolve quatro etapas principais: adesão, proliferação, maturação e dispersão (Figura 9).

Figura 9 - Fases da formação do biofilme de *C. albicans*



Fonte: Adaptado de Talapko; Juzbašić, 2021.

A primeira fase consiste na interação da levedura com o substrato a partir de forças eletrostáticas e hidrofobicidade, sendo mediado por genes relacionados a adesinas (PIERCE *et al.*, 2017). Na fase de proliferação é iniciado o desenvolvimento de pseudo hifas e hifas filamentosas, conferindo robustez ao biofilme (MITCHELL *et al.*, 2017). No processo de maturação, no entanto, é visto a produção da matriz exopolissacarídica conferindo maior proteção ao biofilme, esta é composta principalmente por glicoproteínas e carboidratos (ZARNOWSKI *et al.*, 2014). Por fim, na fase de dispersão é verificado a liberação de células das camadas mais superficiais do biofilme para colonizar outras superfícies, é importante ressaltar que essas células liberadas possuem um perfil de patogenicidade mais virulento (UPPULURI *et al.*, 2018).

Dentre as vantagens na formação desses biofilmes pelos microrganismos, está a proteção contra os fatores imunológicos do hospedeiro e as terapias antifúngicas, além do favorecimento da captação de nutrientes e crescimento celular (TAFF *et al.*, 2012). Todavia, na perspectiva médica, estas comunidades representam um grande desafio, tendo em vista que estas podem ser até 1000 vezes mais resistentes comparado a forma de vida planctônica (HACIOGLU *et al.*, 2018). Desse modo, o desenvolvimento de terapias alternativas tem sido o foco de diversas pesquisas.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar a ação antifúngica de nanoemulsões em função de sua composição, contendo óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth contra *Candida albicans*

3.2 Objetivos específicos

- Realizar coleta, extração e verificar a composição química do óleo essencial da planta *L. origanoides*;
- Encapsular o óleo essencial de *L. origanoides* em diferentes concentrações variando a composição da nanomeulsão usando o óleo de girassol em matriz polimérica de alginato;
- Caracterizar e avaliar a estabilidade das formulações produzida em diferentes concentrações;
- Investigar o potencial antifúngico do óleo essencial e da nanoemulsão de *L. origanoides* em isolados clínicos de *C. albicans* na forma planctônica e de biofilme;
- Analisar citotoxicidade do óleo essencial de *L. origanoides* e das nanoemulsões.



4 ARTIGOS

4.1 Artigo de Revisão

Artigo ACEITO para publicação (Revista Ciência e Natura – Qualis A3)

NANOEMULSÕES DE COMPOSTOS BIOATIVOS VEGETAIS COM APLICAÇÕES ANTIMICROBIANAS: UMA REVISÃO

NANOEMULSIONS OF PLANT-BASED BIOACTIVE COMPOUNDS WITH ANTIMICROBIAL APPLICATIONS: A REVIEW

Júlio César Sousa Prado^I , Guilherme Mendes Prado^I , Francisca Lidiane
Linhares Aguiar^{III} , Andréa Maria Neves^{III} , Joice Farias do Nascimento^{II} ,
Flávia Oliveira Monteiro da Silva Abreu^{II} , Raquel Oliveira dos Santos
Fontenelle^{I, II, III} 

^I Universidade Federal do Ceará (UFC), Sobral, CE, Brasil

^{II} Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brasil

^{III} Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Sobral, CE, Brasil

RESUMO

A busca por agentes antimicrobianos alternativos vem atraindo crescente interesse científico. Os produtos naturais de origem vegetal são fontes de diversas substâncias com atividades biológicas comprovadas, incluindo atividade antimicrobiana. O encapsulamento desses produtos na forma de nanoemulsão busca superar problemas inerentes a esses produtos, como instabilidade e degradação. Com base nessas considerações, realizamos um levantamento bibliográfico de nanoemulsões produzidas a partir de substâncias derivadas de plantas, como óleos essenciais e extratos, com potencial antimicrobiano, com foco nas atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral. Foram utilizados artigos e documentos publicados em periódicos de relevância científica, bem como palavras-chave classificadas nos Descritores em Ciências da Saúde. Todos os documentos relevantes para esta pesquisa relataram que as nanoemulsões carregadas com óleos essenciais e extratos vegetais de diferentes espécies botânicas apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* contra diferentes microrganismos de importância médica, além de potencializar os efeitos antimicrobianos desses bioprodutos. Portanto, antimicrobianos nanoestruturados com óleos essenciais e extratos de plantas podem ser considerados opções de tratamento para doenças microbianas: devido às suas propriedades físico-químicas, atuam como melhores veículos de entrega de produtos naturais com boa biodisponibilidade, reduzindo a toxicidade e prolongando a vida útil desses antimicrobianos naturais, melhorando assim o tratamento de doenças humanas infecciosas.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana; Nanopartículas; Produtos alternativos.

ABSTRACT

The search for alternative antimicrobial agents is attracting increasing scientific interest. Natural products of plant origin are sources of several substances with proven biological activities, including antimicrobial activity. The encapsulation of these products in the form of a nanoemulsion seeks to overcome problems inherent to these products, such as instability and degradation. Based on these considerations, we carried out a bibliographical survey of nanoemulsions produced from plant-derived substances, such as essential oils and extracts, with antimicrobial potential, focusing on antibacterial, antifungal and antiviral activities. Articles and documents published in scientifically relevant journals, as well as keywords classified from Health Sciences Descriptors, were used. All documents relevant to this search reported that nanoemulsions loaded with essential oils and plant extracts from different botanical species had *in vitro* antimicrobial activity against different microorganisms of medical importance, in addition to enhancing the antimicrobial effects of these bioproducts. Therefore, nanostructured antimicrobials with essential oils and plant extracts can be considered treatment options for microbial diseases: due to their physicochemical properties, they act as better delivery vehicles for natural products with good bioavailability, by reducing toxicity and prolonging the useful life of these natural antimicrobials, thus enhancing treatment for infectious human diseases.

Keywords: Antimicrobial activity; Nanoparticles; Alternative products.

1 INTRODUCTION

Infectious diseases occupy fourth place in the ranking of diseases that caused the most hospitalizations and deaths in the world between 2000 and 2019 (PAHO 2020). This fact is directly related to the presence of infectious microorganisms (bacteria, fungi, protozoa and viruses) that cause damage to the host (MADIGAN *et al.* 2016; TORTORA *et al.* 2016). These diseases are generally treated with antimicrobials, substances of natural origin (antibiotics) or synthetic (chemotherapeutics), which act on the microorganisms, inhibiting their growth or causing their death (SÁEZ-LLORENS *et al.* 2000).

Despite the need to use antibiotic therapy to treat infections, there are risks to the health of patients related to the high toxicity of these drugs, some of which are nephrotoxic (KALOYANIDES, 1994), hepatotoxic or ototoxic (OUN *et al.* 2018). They also have a narrow therapeutic window and high teratogenic potential (KALEELULLAH; GARUGULA, 2021). In addition to these drugs' toxicity, another rising problem is microbial resistance, in which these microorganisms develop mechanisms that inactivate the active principle responsible for the antimicrobial action,

which may be related to the action of enzymes, changes in the binding sites, physical barriers or action of efflux pumps (REYGAERT, 2018; KEMBER *et al.* 2022).

Due to these drawbacks of antimicrobial therapy, the need has arising to develop new bioactive substances by molecular alteration of existing drugs or the discovery of new substances with antimicrobial potential (SPELLBERG *et al.* 2015). Among these new substances, the standouts are crude plant-derived substances (isolated by extractive methods) or substances that actively participate in green synthesis processes (GALIE *et al.* 2018).

The effects of active ingredients of plant origin can vary according to the extraction method used, with emphasis on essential oils, aqueous extracts and ethanolic extracts. These methods are responsible obtaining various chemical compounds from the secondary metabolism of plants (WALLACE, 2004). Secondary metabolites have various therapeutic activities, such as antimicrobial and antioxidant (YANG *et al.* 2018; ISAH, 2019).

The encapsulation of these plant compounds in the form of an emulsion has strategic advantages by improving kinetic stability, preserving organoleptic characteristics, and enhancing penetration power, thus enhancing the desired effect (CHINNAIYAN *et al.* 2022; SAHU *et al.* 2018). In addition, they promote greater bioavailability, increase solubility in water of poorly soluble substances and allow their controlled release (KARIM *et al.* 2022).

Therefore, we carried out a bibliographic survey of nanoemulsions produced from active ingredients of plant origin, such as essential oils and extracts, with antimicrobial potential, focusing on antibacterial, antifungal and antiviral activities. The results can contribute to new studies to identify efficient nanoemulsions that can be applied to treat infectious diseases. The information reported here fills in the gaps in knowledge and makes these substances more readily available for future applications in the field of health, thus overcoming the limitations of conventional antimicrobials.

The bibliographic survey was carried out between June and November 2022, in the databases Google Scholar (<<https://scholar.google.com.br>>), PUBMED (<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>>), SciELO (<<https://www.scielo.org/>>), Science Direct (<<https://www.sciencedirect.com/>>), Scopus® (<<https://www.scopus.com/>>), LILACS (<<https://lilacs.bvsalud.org/>>) and BDTD (<<https://btdt.ibict.br/>>). To search for articles, keywords were used

that were classified from the Health Sciences Descriptors (<<https://decs.bvsalud.org/>>): “Nanoemulsion”, “Polymeric Nanoparticles”, “Lipid Nanoparticles”, “Biological Products”, “Anti-Infective Agents”, “Anti-Bacterial Agents”, “Antifungal Agents” and “Antiviral Agents”, for sample refinement. Articles that addressed the topic in question, in Portuguese or English, published in journals present in the platforms mentioned above between 2012 to 2022 were selected for reading in full.

2 DEVELOPMENTS

2.1 Natural products of plant origin

Extracts, isolates and oils extracted from natural sources are widely used for biomedical purposes, since many of them have antimicrobial properties (BOIRE *et al.* 2013; SAMBER *et al.* 2015; MOSTAFA *et al.* 2018; D'AGOSTINO *et al.* 2019). Although natural products have generally presented good results for application in health care, their use faces some limiting factors, such as sensitivity to physical changes, since they are vulnerable to heat, humidity and oxygen. Among the resulting problems are hydrolysis and oxidation reactions, causing structural changes (BHARGAVA *et al.* 2015; GHANI *et al.* 2018; BEDOYA-SERNA *et al.* 2018).

Therefore, they need greater care in their storage, packaging and transport, to assure there are no changes in their properties. In order to protect bioactive compounds, nanotechnology can be applied, with benefits such as bioavailability, protection against degradation, increased apparent solubility, and better physical and chemical biocompatibility of the active principle, thus enhancing the pharmacological action and protecting against toxicity (RAO; KHANUM, 2016; BAZANA *et al.* 2019).

Nanoencapsulated bioactive compounds offer various advantages, such as increased physicochemical stability, better antimicrobial activity, and minimization of side effects (HERCULANO *et al.* 2015; DONSI; FERRARI, 2016).

Encapsulation is a technique widely used in the pharmaceutical, chemical, food and biomedical sectors, in order to promote protection and make products of natural origin more manageable in formulations. Among the encapsulation techniques, the formation of nanoemulsions stands out for the production of drugs, by providing significant protection of these bioactive compounds (BHARGAVA *et al.* 2015; GHANI *et al.* 2018).

2.3 Nanoemulsions

Nanoemulsions are dispersions of two immiscible liquids stabilized by a surfactant, where the size of the dispersed droplets is on a nanometric scale (20 to 500 nm). A nanoemulsion's transparency is directly related to the diameter of the dispersed droplets (translucent < \square 200 nm > milky) (QUINTÃO *et al.* 2013; NASCIMENTO *et al.* 2020). Figure 1 represents the behavior of three nanoemulsions with different diameters of dispersed oily particles.

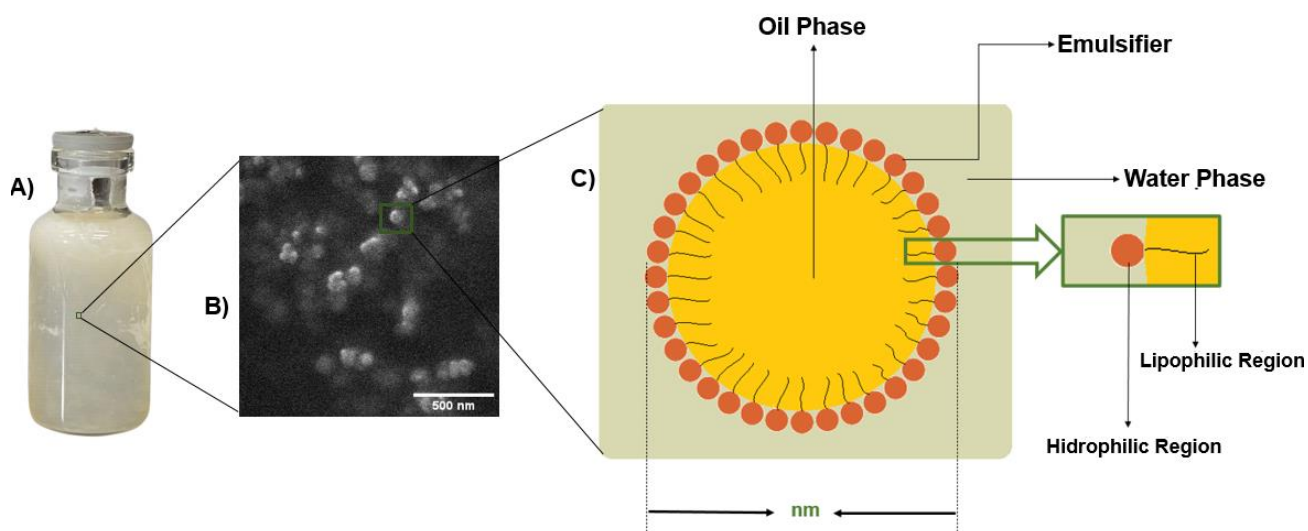
Figure 1 - Nanoemulsions and their behavior against the different diameters of their particles.



Source: Authors' private collection (February 2023)

Nanoemulsions are classified as water-in-oil (W/O) or oil-in-water (O/W), depending on the hydrophilicity or lipophilicity of the dispersing medium (WANG *et al.* 2007). The surfactant acts as a stability barrier of nanoemulsions, characterized as an amphiphilic compound that is positioned between the two phases of the emulsion (W/O or O/W), creating an interfacial film that stabilizes the system (KUMAR; MANDAL, 2018). Figure 2 represents the layout of an O/W nanoemulsion system with the structure of each component, where it is possible to observe the aqueous phase, oil phase and emulsifying agent.

Figure 2 - Representative schematic of oil-in-water nanoemulsion.



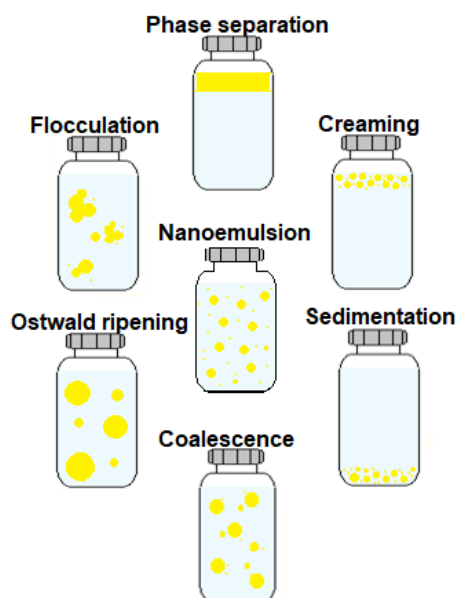
A) Macroscopic view of nanoemulsion (O/W); B) Nanoemulsion scanning eletron microscopy; C) Schematic representation of a micelle, containing the oil phase inside, surrounded by the surfactant. Source: Authors' private collection (February 2023).

The addition of texture modifiers such as polymeric matrices of natural origin to the aqueous phase has often been used to improve the stability of nanoemulsions, since they have surfactant properties, thus possessing emulsifying and thickening capacity. They also coat the individual droplets, reducing their movement and avoiding the destabilization of emulsions and nanoemulsions due to the decrease of the gravitational movement of the oil droplets. This delays or prevents the droplets' coalescence due to the increased viscosity of the aqueous phase (GUERRA-ROSAS *et al.* 2016; MAPHOSA; JIDEANI, 2018).

Emulsifiers or surfactants are fundamental to prevent the aggregation of nanoparticles, even after prolonged storage, by promoting the physicochemical stability of the nanoemulsion (SURASSMO *et al.* 2010). Surfactants are amphiphilic substances and have a polar (hydrophilic) and a nonpolar (lipophilic) region, an ideal characteristic for the formation of O/W or W/O nanoparticles (BOTELHO *et al.* 2018).

Nanoemulsions have good stability of suspended nanoparticles, and the appearance of these systems is strongly related to the size of the formed particles (WEISS *et al.* 2009). The physical destabilization of emulsions is related to the spontaneous tendency to occupy the minimum interfacial space between their immiscible phases (ANTON *et al.* 2008). Figure 3 shows the possible types of physicochemical instabilities related to nanoemulsion systems.

Figure 3 - Representative schematic of nanoemulsion instability.



Source: Authors' private collection (February 2023)

Among the destabilization processes, creaming stands out. It is more likely to occur in O/W nanoemulsions, while sedimentation is more prevalent in W/O nanoemulsions (ZHANG; MCCLEMENTS, 2018). Creaming is the formation of a creamy layer on the surface of the emulsion, which occurs due to the difference in density of the nanoemulsion components and the presence of forces external to the system, such as gravitational and centrifugal forces (REDDY *et al.* 1981; RABINOVICH *et al.* 2004). In both sedimentation and creaming, the difference in the density of the materials and their low solubility in an aqueous medium occur (TADROS, 2006).

Coalescence, flocculation and Ostwald ripening occur due to partial solubilization of the oil phase in the aqueous phase, thus forming larger oil droplets dispersed in the system, which can lead to total phase separation. Flocculation can also be understood as the aggregation between the oil droplets, which consequently can lead to the formation of larger droplets, characterized as coalescence. Ostwald ripening, on the other hand, consists of an increase in the droplet size and a decrease in the total number of dispersed droplets in the system (TADROS, 1996; FRANZOL, REZENDE, 2015).

2.3 Antimicrobial potential of nanoemulsions produced with plant-based bioactive and compounds

The nanoemulsions synthesized with different essential oils and plant extracts have been tested *in vitro* against different microorganisms of medical importance, such as bacteria, viruses and fungi, as shown in Table 1. It summarizes the main reported findings regarding the active plant components, dispersing medium, surfactant, particle size of the nanoemulsions and the species of microorganisms.

Table 1 - Nanoemulsions produced from different plant extracts with antibacterial, antifungal and antiviral properties, in addition to presenting the dispersant medium, surfactant, particle size and the potentiated effect of nanoemulsions.

Plant Antimicrobial	Dispersant/ Surfactant	Size/ Potentiation	Antimicrobial Activity	Ref.
<i>Allium sativum</i> Oil	Water/ Tween 80	36,6 nm / -	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> .	HASSAN; MUJTABA (2019)
<i>Artemisia annua</i> Oil	Water/ Tween 80	130-160 nm / -	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. krusei</i> .	DAS <i>et al.</i> (2020)
<i>Azadirachta indica</i> Oil	Water/ Tween 20	70 nm/ +	<i>Vibrio vulnificus</i>	JEROBIN <i>et al.</i> (2015)
<i>Cinnamomum spp.</i> Oil	Water/ Tween 80	2040-40,4 nm/ -	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	VALIZADEH <i>et al.</i> (2018)
<i>Citrus limonum</i> Oil	Water/ Tween 80	181,5 nm/ +	<i>S. aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Photobacterium damsela</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Pseudomonas luteola</i>	YAZGAN <i>et al.</i> (2019)
<i>Citrus paradisi</i> Oil	Water/ Tween 80	173,9-0,105 nm/ +	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	WANG <i>et al.</i> (2022)
<i>Copaifera langsdorffii</i> Oil	Water/ Tween 80	641,3-29,98 nm/ -	<i>Paracoccidioides lutzii</i> , <i>P. brasiliensis</i> , <i>P. americana</i> , <i>P. restrepiensis</i>	SILVA <i>et al.</i> (2020)
<i>Croton cajucara</i> Oil	Water/ Pluronic	45,56 nm/ -	<i>Absidia cylindrospora</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Mucor circinelloide</i> , <i>M. muceno</i> , <i>M. ramosissimo</i> , <i>Rhizopus microsporu</i> , <i>R. oryzae</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>C. albicans</i>	AZEVEDO <i>et al.</i> (2021)
<i>Cymbopogon martini</i> Oil	Water/ Tween 80	118-12 nm/ +	<i>E. faecalis</i>	MARINKOVIC <i>et al.</i> (2022)
<i>Eucalipto globulus</i>	Sorbitan	100 nm/ -	<i>P. aeruginosa</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i>	QUATRIN <i>et al.</i> (2017)

Plant Antimicrobial	Dispersant/ Surfactant	Size/ Potentiation	Antimicrobial Activity	Ref.
Oil	monooleate/ Tween 80			
<i>Jasminum humile</i> L. Oil	Water/ Tween 80	12-8 nm/ -	<i>HAV</i> (Virus Hepatite A), <i>HSV</i> (Herpes Virus)	MANSOUR <i>et al.</i> (2022)
<i>Jasminum grandiflorum</i> L. Oil				
<i>Lippia sidoides</i> Cham Oil	Compritol 888/ Sodium Odecyl Sulfate	445,5-213,1/ +	<i>Candida auris</i>	BALDIM <i>et al.</i> (2022)
<i>Mauritia flexuosa</i> Lf. Total Oil	Water/ Tween 80	270-196 nm/ -	<i>E. coli</i>	LEÃO <i>et al.</i> (2019)
<i>Melaleuca alternifolia</i> Oil	Water/ Tween 80	500-100 nm/ -	<i>E. coli</i>	WEI <i>et al.</i> (2022)
<i>Mentha pulegium</i> Oil	Water/ Tween 80	125 nm/ -	<i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	DAMANI <i>et al.</i> (2022)
<i>Mentha spicata</i> L. Oil	Water/ Tween 80	51,46 nm/ +	<i>S. typhimurium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>L. monocytogenes</i>	ZAMANIAHARI <i>et al.</i> (2022)
<i>Poiretia latifolia</i> Oil	Water/ Tween 80	-	<i>C. albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>M. canis</i> , <i>Microsporium gypseum</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophyte</i>	PAIM <i>et al.</i> (2018)
<i>Satureja hortensis</i> Oil	Water/ Tween 80	219 nm/ -	<i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	MACCELLI <i>et al.</i> (2020)
<i>Syzygium aromaticum</i> Oil	Water/ Tween 80	-	<i>A. niger</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> .	LIMA <i>et al.</i> (2021)
<i>Stenachaenium megapotamicum</i> Oil	Water/Tween 80	210 nm/ +	<i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Scytalidium dimidiatum</i> , <i>T. rubrum</i>	DANIELLI <i>et al.</i> (2013)

Plant Antimicrobial	Dispersant/ Surfactant	Size/ Potentiation	Antimicrobial Activity	Ref.
<i>Thymus vulgaris</i> Oil	Water/ Tween 80	127 nm/ +	<i>C. albicans, C. glabrata, Candida parapsilosis, A. fumigatus, T. tonsurans, T. rubrum, T. mentagrophytes, M. canis</i> <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>Escherichia</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	MOAZENI <i>et al.</i> (2021) SIENKIEWICZ <i>et al.</i> (2012)
<i>Myrtus commnis</i> L. Oil	Water/ Tween 80	179 nm/ +	<i>E. coli, S. aureus</i>	ROOZITALAB <i>et al.</i> (2022)
<i>Matricaria chamomilla</i> L. Oil	Water/ Tween 80	20 nm/ +	<i>E. coli, P. aeruginosa, B. subtilis, S. aureus, S. pyogenes, S. pombe, C. albicans, C. tropicalis</i>	DAS <i>et al.</i> (2019)
<i>Capsicum annum</i> L. Ethanol Extract	Water/ Tween 80	-	<i>E. coli, S. aureus, C. albicans, Aspergillus niger.</i>	EL-NAGGAR <i>et al.</i> (2020)
<i>Cuphea ígnea</i> Ethanol Extract	Water/ Tween 80	119 nm/ +	SARS CoV-2 (COVID-19)	MAHMOUD <i>et al.</i> (2021)
<i>Curcuma</i> spp. Extract	Water/ Cremophor RH40	40 nm/ +	DENG-1, DENG-2, DENG-3, DENG-4 (DENGUE VÍRUS)	NABILA <i>et al.</i> (2020)
<i>Pimpinella anisum</i> Oil	Water/ Tween 80	117-275 nm/ +	<i>E. coli, L. monocytogenes</i>	TOPUZ <i>et al.</i> (2016)
<i>Pimpinella anisum</i> Ethanol Extract	Water/ Tween 80	400 nm/ +	<i>S. aureus, B. cereus, L. monocytogenes, E. coli, S. typhimurium, P. aeruginosa, Yersinia enterocolitica</i>	GHAZY <i>et al.</i> (2021)
<i>Ginkgo biloba</i> Ethanol Extract	Water/ Tween 80	97 nm/ +	H3N2 (Virus influenza), HBV (Hepatitis B virus)	WANG <i>et al.</i> (2015)
<i>Coriadrum sativum</i> Oil	Chitosan/ Tween 80	80-57 nm/ +	<i>A. Niger, Aspergillus fumigatus, A. sydowii, A. repens, A. versicolor, A. luchuensis, Alternaria alternata, Penicillium italicum, P. crysogenum, P. spnulosum, Mycelia sterilia, Clasoaporium herbarum, Fusarium</i>	DAS <i>et al.</i> (2019)

Plant Antimicrobial	Dispersant/ Surfactant	Size/ Potentiation	Antimicrobial Activity	Ref.
			<i>poae, F. oxysporum.</i>	
<i>Eucalypto citriodora</i> Oil	Chitosan/ Tween 80	1271-388 nm/ +	<i>S. aureus, S. typhimurium</i>	ABREU <i>et al.</i> (2020)
<i>Ocimum gratissimum</i> Linn. Oil	Cashew gum/ Tween 80	500-10 nm/ +	<i>E. coli, S. aureus, Salmonella enterica, Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium bovis,</i>	OKONKWO <i>et al.</i> (2020)
<i>Psidium guajava</i> L.Oil	Chitosan/ Tween 80	96-40 nm/ +	<i>K. pneumoniae</i>	ZHANG <i>et al.</i> (2020)
<i>Phyllanthus niruri</i> Methanolic Extract	Sodium Alginate/ Tween 80	192 nm/ +	<i>E. coli, K. pneumonia, S. aureus. S. typhimurium, Streptococcus mutans, B. subtilis, Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes.</i>	PATHANIA <i>et al.</i> (2022)

⁽⁺⁾Enhanced antimicrobial effect of plant products in the form of nanoemulsions; ⁽⁻⁾Effects not potentiated or indifferent in the form of nanoemulsion.

Source: Authors' (February 2023)

Among the studies analyzed in this review, 91.34% involved nanoemulsions produced with water as the aqueous phase, while the remaining 8.66% involved natural polymer matrices, with chitosan being most prevalent in the formulations. Among the hydrophilic surfactants, Tween 80 is the predominant one, due to its excellent solubility of essential oils and water miscibility. Among the most frequent natural products, essential oils stood out (91.34%), although ethanolic and hydroalcoholic extracts (8.66%) were also observed as active principles in some formulations.

Essential oils are aromatic compounds of natural origin with recognized biological activities. They are used as flavoring additives in foods and stabilizers in cosmetics. Their use as medicinal agents is variously due to their insecticidal, antioxidant, anti-inflammatory, anti-allergic and anticancer activities. Many essential oils also have antibacterial, antiviral and antifungal activities, stimulating their application also as natural antimicrobials in foods and beverages (DONSÌ; FERRARI, 2016).

Over the years, a plethora of research has shown the potent *in vitro* antimicrobial activity of various essential oils and their constituents against a wide range of microorganisms. However, as discussed earlier, the use of essential oils in biomedical systems is challenging due to their low stability and sensitivity to physical changes, since they are highly vulnerable to heat, moisture and oxygen. These problems can be overcome by encapsulating essential oils in suitable delivery systems, helping to improve their stability and biological activity (BHARGAVA *et al.* 2015; GHANI *et al.* 2018; BEDOYA-SERNA *et al.* 2018).

Research has shown that nanoemulsion formulations containing essential oil of *Mentha pulegium* (pennyroyal) (DAMANI *et al.* 2022), *Capsicum annum* L. (pepper) (EL-NAGGAR *et al.* 2020), *Myrtus communis* L. (myrtle) (ROOZITALAB *et al.* 2022), *Allium sativum* (garlic) (HASSAN; MUJTABA, 2019), *Cinnamomum* spp. (cinnamon) (VALIZADEH *et al.* 2018) and *Citrus paradisi* (grapefruit) (WANG *et al.* 2021) have shown antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. It is important to note that the authors reported that the nanoemulsions based on the essential oils of *M. pulegium*, *C. annum*, *M. communis*, *A. sativum* and *Cinnamomum* spp. showed no enhancement effect in comparison with the free form of essential oils in antibacterial tests. In contrast, the nanoemulsion based on the essential oil of *C. paradisi* had a significantly lower minimum inhibitory concentration (MIC) than the free essential oil. In this respect, many reports have shown that the conversion of spice extracts or

essential oils into nanoemulsions greatly improves their antibacterial activity, presumably because the small lipid droplets interact better with microbial cells.

In this respect, it is relevant to highlight the research data of Zamaniahari *et al.* (2022), when investigating the antimicrobial effect of *Mentha spicata* (mint) against pathogens of medical importance. The researchers found that the MIC of the free essential oil was greater than that of the nanoemulsion against *S. typhimurium*, with concentrations of 6 mg/mL of the essential oil in free form and 2 mg/mL in nanoemulsion form. They also reported similar results for *S. aureus* (5mg/mL vs. 2mg/mL), *E. coli* (6mg/mL vs. 2mg/mL), *B. cereus* (4mg/mL vs. 2mg/mL) and *Listeria monocytogenes* (5mg/mL vs. 1mg/mL), respectively. The authors further stated that the bacterial cells were greatly disintegrated and that levels of cell membrane damage were caused by the nanoencapsulated oil against all bacterial species in this study.

Wei *et al.* (2022) analyzed the antimicrobial effects of nanoemulsions carried with the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (melaleuca) and conjugated with antibiotics against six clinical strains of multiresistant *E. coli*. They observed, curiously, that the antibacterial activity of unblended nanoemulsion showed similar results for all multidrug resistant strains of *E. coli* and the reference strain (*E. coli* ATCC 25922) with MIC values of 1 mg/mL. The results of the synergism assays of the nanoemulsion combined with the standard drug had synergy with several antibiotics against multidrug-resistant *E. coli* strains. The researchers also stated that the nanoemulsion combined with doxycycline exhibited bactericidal activity, and that usually bactericidal agents can be clinically recommended instead of bacteriostatic agents, since they can reduce the development of resistance and the spread of infection.

Nanoemulsions prepared with the essential oil of *Artemisia annua* (chamomile), using Tween 80 as surfactant agent, had particles with an average diameter of 160 nm. These were tested to characterize their antimicrobial activity in gram-positive and gram-negative bacteria, as well as in *Candida* species. The nanoemulsions exhibited notable antibacterial and antifungal activities against various microbial strains, with MICs ranging from 1.42 ± 0.64 $\mu\text{g/mL}$ to 3.15 ± 0.16 $\mu\text{g/mL}$ against bacterial strains and from 3.62 ± 0.65 $\mu\text{g/mL}$ to 4.29 ± 0.82 $\mu\text{g/mL}$ against yeasts (DAS *et al.*, 2020). They also observed antimicrobial effects of nanoemulsions based on essential oil of *Citrus limonum* (lemon), Tween 80 and water, which generated nanoemulsions with a mean particle diameter of 181.5 nm. These had minimum inhibitory concentrations ranging from 3,125 to 25 mg/mL against the bacteria *S.*

aureus, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Photobacterium damsela*, *Vibrio vulnificus*, *Proteus mirabilis*, *Serratia liquefacien* and *Pseudomonas luteola* (YAZGAN *et al.* 2019).

Some authors have suggested that the size of the droplets forming the nanoemulsion can affect the desired biological effect, among them the antimicrobial activity, and that this effect depends not only on the individual chemical components used in the formulations, but also on the system's structure (BAKER *et al.* 2003).

Marinkovic *et al.* (2022), investigating the activity against *E. faecalis* of nanoemulsions composed of the essential oil of *C. martinii* (palmarosa) in different concentrations, observed that the most and least efficient nanoemulsions were those with concentrations of 6 mg/mL and 2.5 mg/mL, which had respective droplet sizes of 87 nm and MIC of 0.37 mg/mL versus droplets of 12 nm in diameter and MIC of 2.45 mg/mL. Thus, they noted that the size of the particles was linked to the amount of essential oil used in the formulations, and the antimicrobial effectiveness was not always linked to smaller particle size.

Nanoemulsions with antifungal activity have also been analyzed. Silva *et al.* (2020) evaluated the antifungal activity of nanoemulsions of the essential oil of *Copaifera langsdorffii* (copaiba), using Tween 80 and water, resulting in nanoparticles with an average diameter ranging between 641.3 and 29.98 nm, which showed inhibitory activity against the species *Paracoccidioides lutzii*, *P. brasiliensis*, *P. americana* and *P. restrepiensis*. The nanoemulsion presented MIC value of 125 µg/mL for all studied species. The encapsulation of *Coriandrum sativum* (coriander) essential oil in a chitosan nano-matrix, with an encapsulated nanoparticle size of 57–80 nm, was studied against the fungal species *Aspergillus spp.*, *Alternaria alternata*, *Penicillium spp.*, *Mycelia sterilia*, *Clasoparium herbarum* and *Fusarium spp.*, and the oil-encapsulated nanoemulsion showed antifungal efficacy by hampering the biosynthesis of ergosterol, the main component of the fungal cell membrane, by providing fluidity and permeability to the membrane (DAS *et al.* 2019).

The antifungal activity of nanoemulsions containing the essential oil of *Croton cajucara* (sacaca), using pluronic as surfactant, generating droplets with an average size of 40 nm, was evaluated against the fungal species *Absidia cylindrospora*, *Cunninghamella elegans*, *Mucor spp.*, *Rhizopus spp.*, *Syncephalastrum racemosum* and *C. albicans*, with minimum inhibitory concentrations ranging from 12.21 to 195.31 µg/mL against the studied fungal species (AZEVEDO *et al.* 2021).

The essential oil of *Lippia sidoides* (alecrim pepper) was loaded into lipid-based systems, such as oleic acid along with Compritol and sodium dodecyl sulfate. The authors determined a particle size range of 213.1-445.5 nm. Lipid nanoparticles loaded with the essential oil of *L. sidoides* showed minimum inhibitory concentrations between 281 and 563 µg/mL against multiresistant *C. auris* (BALDIM *et al.* 2022).

The potential has been studied of nanoemulsions synthesized from the ethanolic extract of *Cuphea ignea* (flor-de-santo-antonio), in addition to formulations with the essential oil of *Jasminum humile* L. (jasmine) and ethanolic extract of *Ginkgo biloba*, with findings of antiviral activity against important viruses that cause human infections: SARS CoV-2 (Covid-19) (MAHMOUD *et al.* 2021), HAV (hepatitis A virus), HSV (herpes virus) (MANSOUR *et al.* 2022), H3N2 (influenza virus) and HBV (hepatitis B virus) (WANG *et al.* 2015).

The investigation of physicochemical properties and the carrying capacity of nanoparticle emulsions has led to successful antiviral applications administered by different routes in several *in vitro* and *in vivo* studies. A recent *in vitro* study showed that the cationic particles of a nanoemulsion loaded with *Curcumin* spp. (golden ginger) increased the antiviral activity of *Curcumin* spp. against dengue virus serotypes and improved biocompatibility with target cells (NABILA *et al.* 2020). The cationic surfaces of the particles facilitated binding to negatively charged infected and uninfected cells, improving load delivery and therapeutic efficiency.

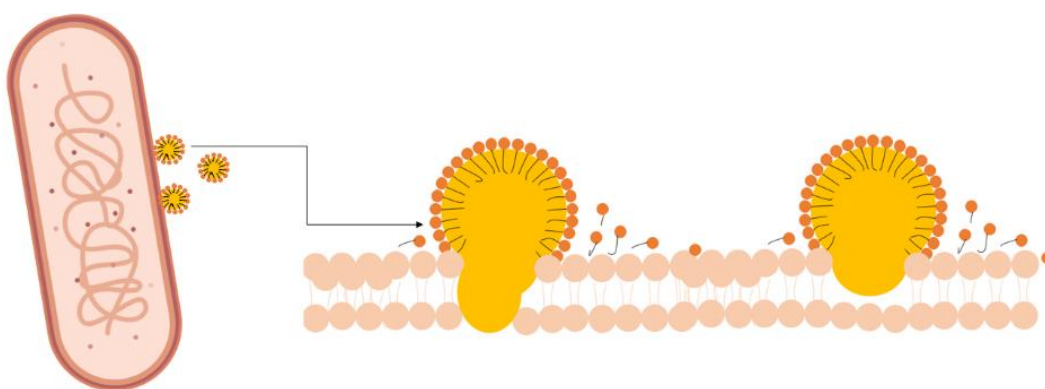
Traditional antiviral drugs are limited by their low solubility, rapid clearance profiles, low bioavailability, nonspecific targeting, and high toxicity (SHAH, 2021). Nanoemulsions can overcome these limitations because these systems are adjustable, with versatile oil cores, improved encapsulation capacity, easy surface modification and flexible dosage forms (DELSHADI *et al.* 2021).

2.3 Nanoemulsions as carriers of natural products and their mechanism of antimicrobial action

Most natural products have low solubility, posing one of the biggest obstacles to the development of usable drugs, such as antimicrobials. This causes extremely low bioavailability, high dosage level and low selectivity (NIELSEN *et al.* 2004). For an antimicrobial compound to be effective, it must interact with the specific target and have minimal interactions with unwanted targets, to increase its potency and reduce adverse effects.

Several studies have sought to avoid these effects by encapsulating antimicrobials in colloidal delivery systems, such as nanoemulsions (WEISS *et al.* 2009; ACEVEDO-FANI *et al.* 2017b; KHANEGHAH *et al.* 2018). Encapsulation involves trapping substances within small micelles to enable their antimicrobial effect (EL-KADER; ABU HASHISH, 2020). Figure 4 represents the interaction of nanoparticles of a nanoemulsion with the microbial cell membrane through simple diffusion.

Figure 4 - Scheme of delivery of nanoemulsion nanoparticles to the microbial cell membrane



Source: Authors' private collection (February 2023)

The literature suggests that the internalization of substances present in nanoparticles into microbial cells occurs through simple diffusion, a process that is caused by the passive movement of nanoparticles from a more concentrated place to a less concentrated one, without energy expenditure (HARUN *et al.* 2018; TO *et al.* 2023).

Their use as drug carriers is promising because it allows the controlled release of an active principle at a specific place in the body for a longer period of time than conventional administration, maintaining the proper therapeutic concentration and avoiding the need for repeated administration (PARK *et al.* 1999; KUMAR, 2000; KSHISAGAR *et al.* 2005). Figure 5 shows a comparison of plasma drug levels achieved in conventional therapeutic administration and via controlled release administration.

The benefits include increased selectivity and reduced side effects (KSHISAGAR, 2005; WANG *et al.* 2008; BEDIN *et al.* 2011), increased apparent solubility, biocompatibility and protection against physical and chemical degradation of the active principle, inducing increased pharmacological action and protection against

toxicity, increased dispersibility in water, resistance to environmental conditions, and antimicrobial potency (RAY *et al.* 2016; FERREIRA; NUNES, 2019).

The hydrophobicity of dispersants and surfactants together with the phytochemicals present in essential oils collectively contribute to the antimicrobial activities of nanoemulsions. These activities occur due to action on one or more binding targets in the microbial cell. Knowing the target of action is of fundamental importance to ensure that nanoemulsions have specificity for pathogens and that they will not bind to host cells causing unwanted effects.

Currently known antimicrobials act mainly on membrane and cell wall targets. In bacteria, the targets are inhibition of cell wall precursors, binding to ribosomes to prevent synthesis of essential proteins, inhibition of nucleic acid synthesis, inhibition of the metabolic pathway, and membrane disruption caused by inhibition of important cell membrane precursors (PURSSEL, 2019). In fungi, the most common mechanisms include inhibition of ergosterol biosynthesis (azole derivatives), inhibition of DNA replication and protein synthesis (5-fluorocytosine), binding to ergosterol present in the membrane creating pores that culminate in cell leakage (polyenes) and inhibition of the synthesis of 1,3- β -D-glucan, which constitutes the cell wall (echinocandins) (IVANOV *et al.* 2022).

Antifungal drugs usually have important cytotoxic effects due to the similarity of fungal and human cells (both are eukaryotic). Therefore, the search for compounds that have specific targets of action in fungal cells is a challenge.

Krishnamoorthy *et al.* (2021) presented evidence that a nanoemulsion inhibited the synthesis by *C. albicans* of chitin, an important polysaccharide that makes up the yeast wall. Microscopic images showed disruption of the yeast cell wall, probably caused by inhibition of cell wall polysaccharides. In turn, Pannu *et al.* (2009) reported that NB-002, a nanoemulsion with activity against filamentous fungi, dermatophytes and *C. albicans*, had a fungistatic effect, and microscopic images demonstrated that the compound caused rupture of the fungal wall of *T. rubrum*.

Similar to what occurs in fungi, in bacteria nanoemulsions cause membrane disruption. Several studies using micrographs obtained from scanning electron microscopy (SEM) and protein leak tests supported this evidence (MOGHIMI *et al.* 2016; YANG *et al.* 2022). This rupture causes irreversible damage to the bacterial membrane, culminating in cell lysis. This mechanism was observed in both gram-negative and gram-positive bacteria.

The physicochemical properties of surfactants influence the mechanism of action of nanoemulsions. In gram-negative bacteria, some surfactants can better translocate through the peptidoglycan outer membrane and accumulate in the inner membrane (SHARMA *et al.* 2021). Cationic surfactants have better activity compared to nanoemulsions with anionic surfactants because this property provides an electrostatic interaction with the negative membrane of bacteria (AL-ADHAM *et al.* 2021).

3 CONCLUSIONS

Nanoemulsions loaded with essential oils and plant extracts from the different botanical species reported here showed *in vitro* antimicrobial activity against different microorganisms of medical importance, in addition to enhancing the antimicrobial effects of these bioproducts. Therefore, nanostructured antimicrobials with essential oils and plant extracts can be considered treatment options for microbial diseases. Due to their physicochemical properties, they will provide better delivery of natural products with good bioavailability, by reducing their toxicity and prolonging the useful life of natural antimicrobials, improving treatment of infectious human diseases.

However, more studies are needed regarding the methods and conditions for production of nanoemulsions, as well as their properties and safety, because of the limited understanding of their mechanisms and consequences on health. The consideration of all these factors is necessary for the production of nanoemulsions on an industrial scale, in turn for the development of products with better quality and safety and lower costs.

REFERENCES

- ABREU, F. O. M. D. S.; COSTA, E. F.; CARDIAL, M. R. L.; ANDRÉ W. P. P. Polymeric nanoemulsions enriched with *Eucalyptus citriodora* essential oil. **Polímeros**, 30, 2022. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.00920>
- ACEVEDO-FANI, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Nanostructured emulsions and nanolaminates for delivery of active ingredients: Improving food safety and functionality. **Trends in Food Science & Technology**, 60, 12-22, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.027>
- AL-ADHAM, I. S.; JABER, N.; AL-REMAWI, M.; AL-AKAYLEH, F.; AL-KAISSI, E.; ALI AGHA, A. S. A.; ... & COLLIER, P. J. A review of the antimicrobial activity of

thermodynamically stable microemulsions. **Letters in Applied Microbiology**, 75(3), 537-547, 2022. <https://doi.org/10.1111/lam.13570>

ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review. **Journal of controlled release**, 128(3), 185-199, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.02.007>

AZEVEDO, M. M.; ALMEIDA, C. A.; CHAVES, F. C.; RICCI-JÚNIOR, E.; GARCIA, A. R.; RODRIGUES, I. A.; ... ALVIANO, D. S. *Croton cajucara* essential oil nanoemulsion and its antifungal activities. **Processes**, 9(11), 2021. <https://doi.org/10.3390/pr9111872>

BAKER, J. R.; HAMOUDA, T.; SHIH, A.; MYC, A. **US Patent** No. 6,559,189, 2003.

BALDIM, I.; PAZIANI, M. H.; GRIZANTE-BARIÃO, P. H.; KRESS, M. R. V. Z.; OLIVEIRA, W. P. Nanostructured lipid carriers loaded with *Lippia sidoides* essential oil as a strategy to combat the multidrug-resistant *Candida auris*. **Pharmaceutics**, 14(1), 180, 2022. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010180>

BAZANA, M. T.; CODEVILLA, C. F.; MENEZES, C. R; Nanoencapsulation of bioactive compounds: Challenges and perspectives. **Current opinion in food science**, 26, 47-56, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.03.005>

BEDIN, A. C. Nanoemulsões contendo benzoilmetronidazol: desenvolvimento, caracterização e estudo de liberação *in vitro*, 2011.

BEDOYA-SERNA, C. M.; DACANAL, G. C.; FERNANDES, A. M.; PINHO, S. C. Antifungal activity of nanoemulsions encapsulating oregano (*Origanum vulgare*) essential oil: *in vitro* study and application in Minas Padrão cheese. **Brazilian journal of microbiology**, 49, 929-935, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.05.004>

BHARGAVA, K.; CONTI, D. S.; ROCHA, S. R.; ZHANG, Y. Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. **Food microbiology**, 47, 69-73, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.007>

BOIRE, N. A.; RIEDEL, S.; PARRISH, N. M. Essential oils and future antibiotics: new weapons against emerging ‘superbugs’. **J Anc Dis Prev Rem**, 1(2), 105, 2013. <http://dx.doi.org/10.4172/jadpr.1000105>

BOTELHO, B. O.; MELO, D. C. A.; FONTES, C.; QUEIROZ, V. T.; COSTA, A. V.; MARTINS, I. V. F. Aplicação de nanoemulsões na agricultura e medicina veterinária. **TÓPICOS ESPECIAIS EM CIÊNCIA ANIMAL VII**, 143, 2018.

CHINNAIYAN, S. K.; PANDIYAN, R.; NATESAN, S.; CHINDAM, S.; GOUTI, A. K.; SUGUMARAN, A. Fabrication of basil oil Nanoemulsion loaded gellan gum hydrogel—Evaluation of its antibacterial and anti-biofilm potential. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 68, 103129, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103129>

D'AGOSTINO, M.; TESSE, N.; FRIPPIAT, J. P.; MACHOUART, M.; DEBOURGOGNE, A. Essential oils and their natural active compounds presenting antifungal properties. **Molecules**, 24(20), 3713, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24203713>

DAMANI, M. H.; PARTOVI, R.; SHAHAVI, M. H.; AZIZKHANI, M. Nanoemulsions of *Trachyspermum copticum*, *Mentha pulegium* and *Satureja hortensis* essential oils: formulation, physicochemical properties, antimicrobial and antioxidant efficiency. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 16(3), 1807-1819, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01294-5>

DANIELLI, L. J.; REIS, M.; BIANCHINI, M.; CAMARGO, G. S.; BORDIGNON, S. A.; GUERREIRO, I. K.; ... APEL, M. A. Antidermatophytic activity of volatile oil and nanoemulsion of *Stenachaenium megapotamicum* (Spreng.) Baker. **Industrial crops and products**, 50, 23-28, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.027>

DAS, S.; HORVÁTH, B.; ŠAFRANKO, S.; JOKIĆ, S.; SZÉCHENYI, A.; KŐSZEGI, T. Antimicrobial activity of chamomile essential oil: Effect of different formulations. **Molecules**, 24(23), 4321, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24234321>

DAS, S.; SINGH, V. K.; DWIVEDY, A. K.; CHAUDHARI, A. K.; UPADHYAY, N.; SINGH, P.; ... DUBEY, N. K. Encapsulation in chitosan-based nanomatrix as an efficient green technology to boost the antimicrobial, antioxidant and in situ efficacy of *Coriandrum sativum* essential oil. **International journal of biological macromolecules**, 133, 294-305, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.070>

DAS, S.; VÖRÖS-HORVÁTH., B; BENCSIK., T; MICALIZZI, G.; MONDELLO, L.; HORVÁTH, G.; ... SZÉCHENYI, A. Antimicrobial activity of different Artemisia essential oil formulations. **Molecules**, 25(10), 2390, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25102390>

DELSHADI, R.; BAHRAMI, A.; MCCLEMENTS, D. J.; MOORE, M. D.; WILLIAMS, L. Development of nanoparticle-delivery systems for antiviral agents: A review. **Journal of Controlled Release**, 331, 30-44, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.01.017>

DONSÌ, F; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of biotechnology**, 233, 106-120, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.005>

EL-KADER, A.; ABU HASHISH, H. Encapsulation techniques of food bioproduct. **Egyptian Journal of Chemistry**, 63(5), 1881-1909, 2020. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2019.16269.1993>

EL-NAGGAR, M. E.; SOLIMAN, R. A.; MORSY, O. M.; ABDEL-AZIZ, M. S. Nanoemulsion of Capsicum fruit extract as an eco-friendly antimicrobial agent for production of medical bandages. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 23, 101516, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101516>

FERREIRA, C. D.; NUNES, I. L. Oil nanoencapsulation: development, application, and incorporation into the food market. **Nanoscale research letters**, *14*, 1-13., 2019. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2829-2>

FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**, *25*, 1-9, 2015. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.1669>

GALIE, S.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C.; MIGUÉLEZ, E. M.; VILLAR, C. J.; LOMBÓ, F. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. **Frontiers in microbiology**, *9*, 898, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>

GHANI, S.; BARZEGAR, H.; NOSHAD, M.; HOJJATI, M. The preparation, characterization and in vitro application evaluation of soluble soybean polysaccharide films incorporated with cinnamon essential oil nanoemulsions. **International journal of biological macromolecules**, *112*, 197-202, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.145>

GHAZY, O. A.; FOUAD, M. T.; SALEH, H. H.; KHOLIF, A. E.; MORSY, T. A. Ultrasound-assisted preparation of anise extract nanoemulsion and its bioactivity against different pathogenic bacteria. **Food chemistry**, *341*, 128259, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128259>

GUERRA-ROSAS, M. I.; MORALES-CASTRO, J.; OCHOA-MARTÍNEZ, L. A.; SALVIA-TRUJILLO, L.; MARTÍN-BELLOSO, O. Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, *52*, 438-446, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.017>

HARUN, S. N.; NORDIN, S. A.; ABD GANI, S. S.; SHAMSUDDIN, A. F.; BASRI, M.; BASRI, H. B. Development of nanoemulsion for efficient brain parenteral delivery of cefuroxime: Designs, characterizations, and pharmacokinetics. **International journal of nanomedicine**, *13*, 2571, 2018. <https://doi.org/10.2147/IJN.S151788>

HASSAN, K. A.; MUJTABA, M. A. Antibacterial efficacy of garlic oil nano-emulsion. **AIMS Agriculture and Food**, *4*(1), 194-205, 2019. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2019.1.194>

HERCULANO, E. D.; PAULA, H. .C; FIGUEIREDO, E. A.; DIAS, F. G.; PEREIRA, V. D. A. Physicochemical and antimicrobial properties of nanoencapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil. **LWT-Food Science and Technology**, *61*(2), 484-491, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.001>

ISAH, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological research**, *52*, 2019. <https://dx.doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>

IVANOV, M.; ĆIRIĆ, A.; STOJKOVIĆ, D. Emerging antifungal targets and strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, *23*(5), 2756, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23052756>

JEONG, S. H.; HUH, K. M.; PARK, K. Hydrogel drug delivery systems. In **Polymers in drug delivery** (pp. 49-62), 2006.

JEROBIN, J.; MAKWANA, P.; SURESH KUMAR, R. S.; SUNDARAMOORTHY, R.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Antibacterial activity of neem nanoemulsion and its toxicity assessment on human lymphocytes *in vitro*. **International journal of nanomedicine**, 10(sup2), 77-86, 2015.

KALEELULLAH, R. A.; GARUGULA, N. Teratogenic Genesis in Fetal Malformations. **Cureus**, 13(2), 2021. <https://doi.org/10.7759/cureus.13149>

KALOYANIDES, G. J. Antibiotic-related nephrotoxicity. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association*, 9, 130-134, 1994.

KARIM, A.; REHMAN, A.; FENG, J.; NOREEN, A.; ASSADPOUR, E.; KHARAZMI, M. S.; JAFARI, S. M. Alginate-based nanocarriers for the delivery and controlled-release of bioactive compounds. **Advances in Colloid and Interface Science**, 102744, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102744>

KEMBER, M.; GRANDY, S.; RAUDONIS, R.; CHENG, Z. Non-canonical host intracellular niche links to new antimicrobial resistance mechanism. **Pathogens**, 11(2), 220, 2022. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020220>

KHANEGHAH, A. M.; HASHEMI, S. M. B.; LIMBO, S. Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. **Food and Bioproducts Processing**, 111, 1-19, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.05.001>

KRISHNAMOORTHY, R.; GASSEM, M. A.; ATHINARAYANAN, J.; PERIYASAMY, V. S.; PRASAD, S.; ALSHATWI, A. A. Antifungal activity of nanoemulsion from Cleome viscosa essential oil against food-borne pathogenic *Candida albicans*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 28(1), 286-293, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.001>

KSHIRSAGAR, N. A.; PANDYA, S. K.; KIRODIAN, B. G.; SANATH, S. Liposomal drug delivery system from laboratory to clinic. **Journal of postgraduate medicine**, 51(5), 5, 2015.

KUMAR, N.; MANDAL, A. Surfactant stabilized oil-in-water nanoemulsion: stability, interfacial tension, and rheology study for enhanced oil recovery application. **Energy & fuels**, 32(6), 6452-6466, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.8b00043>

KUMAR, M. N. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and functional polymers**, 46(1), 1-27, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(00\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00038-9)

LEÃO, K. M. M.; REIS, L. V. C.; SPERANZA, P.; RODRIGUES, A. P.; RIBEIRO, A. P. B.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. Physicochemical characterization and antimicrobial activity in novel systems containing buriti oil and structured lipids

nanoemulsions. **Biotechnology reports**, 24, e00365, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00365>

LIMA, T. P.; SOUSA, T. L.; OLIVEIRA, J. P. M.; FELIZARDO, M. G. A. C.; EVERTON, G. O; MOUCHREK FILHO, V. E. Chemical profile, thermodynamic stability and fungicidal activity of the nanoemulsion incorporated with essential oil and hydroalcoholic extract of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & LM. Perry. **Ciência e Natura**, 43, 77, 2021. <https://doi.org/10.5902/2179460X63929>

MACCELLI, A.; VITANZA, L.; IMBRIANO, A.; FRASCHETTI, C.; FILIPPI, A.; GOLDONI, P.; ... RINALDI, F. *Satureja montana* L. Essential oils: Chemical profiles/phytochemical screening, antimicrobial activity and o/w nanoemulsion formulations. **Pharmaceutics**, 12(1), 7, 2019.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010007>

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Brock's Microbiology-14^a Edition**. Artmed Publisher, 2016.

MAHMOUD, D. B.; ISMAIL, W. M.; MOATASIM, Y.; KUTKAT, O.; ELMESHAD, A. N.; EZZAT, S. M.; ... MOSTAFA, A. Delineating a potent antiviral activity of *Cuphea ignea* extract loaded nano-formulation against SARS-CoV-2: In silico and in vitro studies. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 66, 102845, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102845>

MANSOUR, K. A.; EL-NEKETI, M; LAHLOUB, M. F.; ELBERMAWI, A. Nanoemulsions of *Jasminum humile* L. and *Jasminum grandiflorum* L. Essential Oils: An Approach to Enhance Their Cytotoxic and Antiviral Effects. **Molecules**, 27(11), 3639, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27113639>

MAPHOSA, Y.; JIDEANI, V. A. Factors affecting the stability of emulsions stabilised by biopolymers. **Science and technology behind Nanoemulsions**, 65, 2018.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.75308>

MARINKOVIĆ, J.; BOŠKOVIĆ, M.; TASIĆ, G.; VASILJEVIĆ, B.; MARKOVIĆ, D.; MARKOVIĆ, T.; NIKOLIĆ, B. *Cymbopogon martinii* essential oil nanoemulsions: Physico-chemical characterization, antibacterial and antibiofilm potential against *Enterococcus faecalis*. **Industrial Crops and Products**, 187, 115478, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115478>

MOAZENI, M.; DAVARI, A.; SHABANZADEH, S.; AKHTARI, J.; SAEEDI, M.; MORTYEZA-SEMNANI, K.; ... NOKHODCHI, A. In vitro antifungal activity of *Thymus vulgaris* essential oil nanoemulsion. **Journal of Herbal Medicine**, 28, 100452, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2021.100452>

MOGHIMI, R.; ALIAHMADI, A.; MCCLEMENTS, D. J.; RAFATI, H. Investigations of the effectiveness of nanoemulsions from sage oil as antibacterial agents on some food borne pathogens. **LWT-Food Science and Technology**, 71, 69-76, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.018>

MOSTAFA, A. A.; AL-ASKAR, A. A.; ALMAARY, K. S.; DAWOUD, T. M.; SHOLKAMY, E. N.; BAKRI, M. M. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. **Saudi journal of biological sciences**, 25(2), 361-366, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.02.004>

NABILA, N.; SUADA, N. K.; DENIS, D.; YOHAN, B.; ADI, A. C.; VETERINI, A. S.; ... RACHMAWATI, H. Antiviral action of curcumin encapsulated in nanoemulsion against four serotypes of dengue virus. **Pharmaceutical Nanotechnology**, 8(1), 54-62, 2020. <https://doi.org/10.2174/2211738507666191210163408>

NASCIMENTO, J. F.; COSTA, E. F.; ABREU, F. O. M. S. CARACTERIZAÇÕES DE NANOEMULSÕES DE ALGINATO DE SÓDIO COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus citriodora*. **Revista Coleta Científica**, 4(8), 15-22, 2020. <https://doi.org/10.7910/DVN/7QGVTR>

NIELSEN, S. F.; BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHØNNING, K.; KROMANN, H. Antibacterial chalcones—bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. **Bioorganic & medicinal chemistry**, 12(11), 3047-3054, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.071>

OKONKWO, S.; EMEJE, M.; PETERS, O.; OKHALE, S. Extraction and Nanoencapsulation of *Ocimum Gratissimum* Leaf Extract and Its Anti-Mycobacterial Activities. **Extraction**, 12(2), 2020. <https://doi.org/10.7176/CMR/12-2-03>

OUN, R.; MOUSSA, Y. E.; WHEATE, N. J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. **Dalton transactions**, 47(19), 6645-6653, 2018. <https://doi.org/10.1039/C8DT90088D>

PAHO - **Pan American Health Organization**. WHO reveals the main causes of death and disability worldwide between 2000 and 2019. December 9, 2020. Available at: <<https://www.paho.org/pt/noticias/9-12-2020-oms-reveals-main-causes-of-death-and-disability-and-m-all-world-between-2000-and>>. Accessed on: November 13, 2021

PAIM, L. F. N. A.; DALLA LANA, D. F.; GIARETTA, M.; DANIELLI, L. J.; FUENTEFRIA, A. M.; APEL, M. A.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C. *Poiretia latifolia* essential oil as a promising antifungal and anti-inflammatory agent: Chemical composition, biological screening, and development of a nanoemulsion formulation. **Industrial crops and products**, 126, 280-286, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.016>

PANNU, J.; MCCARTHY, A.; MARTIN, A.; HAMOUDA, T.; CIOTTI, S.; FOTHERGILL, A.; SUTCLIFFE, J. NB-002, a novel nanoemulsion with broad antifungal activity against dermatophytes, other filamentous fungi, and *Candida albicans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 53(8), 3273-3279, 2019. <https://doi.org/10.1128/AAC.00218-09>

PATHANIA, R.; NAJDA A.; CHAWLA, P.; KAUSHIK, R.; KHAN, M. A. Low-energy assisted sodium alginate stabilized *Phyllanthus niruri* extract nanoemulsion: Characterization, in vitro antioxidant and antimicrobial application. **Biotechnology Reports**, 33, e00711, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00711>

PURSELL, E. Antimicrobials. *Understanding Pharmacology in Nursing Practice*, 147-165, 2019.

QUATRIN, P. M.; VERDI, C. M.; SOUZA, M. E.; GODOI, S. N.; KLEIN, B.; GUNDEL, A.; ... SANTOS, R. C. V. Antimicrobial and antibiofilm activities of nanoemulsions containing *Eucalyptus globulus* oil against *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* spp. **Microbial pathogenesis**, 112, 230-242, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.062>

QUINTÃO, F. J.; TAVARES, R. S.; VIEIRA-FILHO, S. A.; SOUZA, G. H.; SANTOS, O. D. Hydroalcoholic extracts of *Vellozia squamata*: study of its nanoemulsions for pharmaceutical or cosmetic applications. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 23(1), 101-107, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000001>

RABINOVICH-GUILATT, L.; COUVREUR, P.; LAMBERT, G.; GOLDSTEIN, D.; BENITA, S.; DUBERNET, C. Extensive surface studies help to analyse zeta potential data: the case of cationic emulsions. **Chemistry and Physics of Lipids**, 131(1), 1-13, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2004.04.003>

RAO, P. J.; KHANUM, H. A green chemistry approach for nanoencapsulation of bioactive compound—Curcumin. **LWT-Food Science and Technology**, 65, 695-702, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.070>

RAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. **Food bioscience**, 13, 76-83, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.009>

REDDY, S. R.; MELIK, D. H.; FOGLER, H. S. Emulsion stability—theoretical studies on simultaneous flocculation and creaming. **Journal of Colloid and Interface Science**, 82(1), 116-127, 1981. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(81\)90129-6](https://doi.org/10.1016/0021-9797(81)90129-6)

REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS microbiology**, 4(3), 482, 2018. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>

ROOZITALAB, G.; YOUSEFPOOR, Y.; ABDOLLAHI, A.; SAFARI, M.; RASTI, F.; OSANLOO, M. Antioxidative, anticancer, and antibacterial activities of a nanoemulsion-based gel containing *Myrtus communis* L. essential oil. **Chemical Papers**, 76(7), 4261-4271, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11696-022-02185-1>

SAEZ-LLORENS, X.; WONG, M. M. C.; CASTANO, E. DE SUMAN ONIX, DE MORÖS DAYSI., & DE ATENCIO IRIS Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: a lesson from a pediatric institution in a developing country. **The Pediatric infectious disease journal**, 19(3), 200-206, 2000.

SAHU, S.; KATIYAR, S. S.; KUSHWAH, V.; JAIN, S.; Active natural oil-based nanoemulsion containing tacrolimus for synergistic antipsoriatic efficacy. **Nanomedicine**, 13(16), 1985-1998, 2018. <https://doi.org/10.2217/nmm-2018-0135>

SAMBER, N.; KHAN, A.; VARMA, A.; MANZOOR, N. Synergistic anti-candidal activity and mode of action of *Mentha piperita* essential oil and its major components. **Pharmaceutical biology**, 53(10), 1496-1504, 2015. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.989623>

SHAH, S.; CHOUGULE, M. B.; KOTHA, A. K.; KASHIKAR, R.; GODUGU, C.; RAGHUVANSHI, R. S.; ... SRIVASTAVA, S. Nanomedicine based approaches for combating viral infections. **Journal of Controlled Release**, 338, 80-104, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.08.011>

SHARMA, P.; VAIWALA, R.; PARTHASARATHI, S.; PATIL, N.; VERMA, A.; WASKAR, M.; ... AYAPPA, K. G. Interactions of surfactants with the bacterial cell wall and inner membrane: Revealing the link between aggregation and antimicrobial activity. **Langmuir**, 38(50), 15714-15728, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c02520>

SIENKIEWICZ, M.; ŁYSAKOWSKA, M.; DENYS, P.; KOWALCZYK, E. The antimicrobial activity of thyme essential oil against multidrug resistant clinical bacterial strains. **Microbial drug resistance**, 18(2), 137-148, 2012. <https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0080>

SILVA, L. C.; MIRANDA, M. A. C. M.; FREITAS, J. V.; FERREIRA, S. F. A.; LIMA, E. C. O.; OLIVEIRA, C. M. A.; ... PEREIRA, M. Antifungal activity of Copaiba resin oil in solution and nanoemulsion against *Paracoccidioides* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, 51, 125-134, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00201-3>

SPELLBERG, B.; BARTLETT, J.; WUNDERINK, R.; GILBERT, D. N. Novel approaches are needed to develop tomorrow's antibacterial therapies. **American journal of respiratory and critical care medicine**, 191(2), 135-140, 2015. <https://doi.org/10.1164/rccm.201410-1894OE>

SURASSMO, S.; MIN, S. G.; BEJRAPHA, P.; CHOI, M. J. Effects of surfactants on the physical properties of capsicum oleoresin-loaded nanocapsules formulated through the emulsion-diffusion method. **Food Research International**, 43(1), 8-17, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.008>

TADROS, T. Principles of emulsion stabilization with special reference to polymeric surfactants. **Journal of cosmetic science**, 57(2), 153-169, 2006.

TADROS, T. F. Correlation of viscoelastic properties of stable and flocculated suspensions with their interparticle interactions. **Advances in colloid and interface science**, 68, 97-200, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(96\)90047-0](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(96)90047-0)

TO, D.; KAKAR, A.; KALI, G.; WIBEL, R.; KNOLL, P.; MARX, F.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Iminated aminoglycosides in self-emulsifying drug delivery systems: Dual approach to break down the microbial defense. **Journal of Colloid and Interface Science**, 630, 164-178, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.10.077>

TOPUZ, O. K.; ÖZVURAL, E. B.; ZHAO, Q.; HUANG, Q.; CHIKINDAS, M.; GÖLÜKÇÜ, M. Physical and antimicrobial properties of anise oil loaded

nanoemulsions on the survival of foodborne pathogens. **Food chemistry**, 203, 117-123, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.051>

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiology-12^a Edition**. Artmed Publisher, 2016.

VALIZADEH, A.; SHIRZAD, M.; ESMAEILI, F.; AMANI, A. Increased antibacterial activity of cinnamon oil microemulsion in comparison with cinnamon oil bulk and nanoemulsion. **Nanomedicine Research Journal**, 3(1), 37-43, 2018.

WALLACE, R. J Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. **Proceedings of the nutrition society**, 63(4), 621-629, 2004. <https://doi.org/10.1079/PNS2004393>

WANG, C. Z.; LI, W. J.; TAO, R.; YE, J. Z.; ZHANG, H. Y. Antiviral activity of a nanoemulsion of polyphenols from ginkgo leaves against influenza A H3N2 and hepatitis B virus in vitro. **Molecules**, 20(3), 5137-5151, 2015. <https://doi.org/10.3390/molecules20035137>

WANG, L.; LI, X.; ZHANG, G.; DONG, J.; EASTOE, J. Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations. **Journal of colloid and interface science**, 314(1), 230-235, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.04.079>

WANG, S.; LIANG, X.; ZHAO, W.; MI, X.; ZHANG, C.; ZHANG, W.; ... JIANG, Y. Preparation of nanoemulsion of grapefruit seed extract and evaluation of its antibacterial activity. **Journal of Food Processing and Preservation**, 46(1), e16197, 2022. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16197>

WANG, J. J.; SUNG, K. C.; YEH, C. H.; FANG, J. Y. The delivery and antinociceptive effects of morphine and its ester prodrugs from lipid emulsions. **International journal of pharmaceuticals**, 353(1-2), 95-104, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.013>

WEI, S.; TIAN, Q.; ZHAO, X.; LIU, X.; HUSIEN, H. M.; LIU, M.; ... LI, J. Tea Tree Oil Nanoemulsion Potentiates Antibiotics against Multidrug-Resistant *Escherichia coli*. **ACS Infectious Diseases**, 8(8), 1618-1626, 2022. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00223>

WEISS, J.; GAYSINSKY, S.; DAVIDSON, M.; MCCLEMENTS, J. Nanostructured encapsulation systems: food antimicrobials. In **Global issues in food science and technology**, 425-479, 2009. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374124-0.00024-7>

YANG, L.; WEN, K. S.; RUAN, X.; ZHAO, Y. X.; WEI, F.; WANG, Q. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. **Molecules**, 23(4), 762, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>

YANG, R.; MIAO, J.; ZHANG, Z.; WAN, C.; ZOU, L.; CHEN, C.; CHEN, J. Untargeted lipidomics reveals the antifungal mechanism of essential oils nanoemulsion against *Penicillium digitatum*. **LWT**, 168, 113909, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113909>

YAZGAN, H.; OZOGUL, Y.; KULEY, E. Antimicrobial influence of nanoemulsified lemon essential oil and pure lemon essential oil on food-borne pathogens and fish spoilage bacteria. **International journal of food microbiology**, 306, 108266, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108266>

ZAMANIAHARI, S.; JAMSHIDI, A.; MOOSAVY, M. H.; KHATIBI, S. A. Preparation and evaluation of *Mentha spicata* L. essential oil nanoemulsion: physicochemical properties, antibacterial activity against foodborne pathogens and antioxidant properties. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 16(4), 3289-3300, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01436-9>

ZHANG, F.; RAMACHANDRAN, G.; MOTHANA, R. A.; NOMAN, O. M.; ALOBAID, W. A.; RAJIVGANDHIG; MANOHARAN, N. Anti-bacterial activity of chitosan loaded plant essential oil against multi drug resistant *K. pneumoniae*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 27(12), 3449-3455, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.025>

ZHANG, Z.; MCCLEMENTS, D. J. Overview of nanoemulsion properties: stability, rheology, and appearance. In **Nanoemulsions** (pp. 21-49). Academic Press, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00002-3>

4.2 Artigo Experimental

Artigo a submeter (Journal of Applied Microbiology- Impact Factor 4.059 – Qualis A3)

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* Kunth FRENTE A *Candida albicans*

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF NANOEMULSIONS CONTAINING ESSENTIAL OIL FROM *Lippia origanoides* Kunth AGAINST *Candida albicans*

Júlio César Sousa Prado^{1*}; Francisca Lidiane Linhares Aguiar²; Guilherme Mendes Prado¹; Joice Farias do Nascimento³; Natália Vasconcelos de Sousa⁴; Francisco Cesar Barroso Barbosa¹; Danielle Malta Lima⁵; Tigressa Helena Soares Rodrigues²; Flavia Oliveira Monteiro da Silva Abreu³; Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle^{1,2,3}.

¹Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, PPGCS. ²Universidade Estadual Vale do Acaraú, Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Laboratório de Microbiologia. ³Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de Polímeros Naturais – LAPONAT, PPGCN. ⁴Universidade de Fortaleza, PPGCM.

*cesarprado55@gmail.com

RESUMO

As infecções fúngicas causadas por *Candida albicans* são um problema global de saúde pública. Essas infecções são tratadas com antifúngicos, mas cada vez mais esses fungos apresentam resistência a esses medicamentos, o que dificulta seu tratamento. Nanoemulsões à base de óleos essenciais vegetais têm se mostrado uma alternativa promissora, aumentando a solubilidade e a biodisponibilidade dos compostos ativos dos óleos essenciais, o que pode melhorar sua eficácia e segurança. O presente estudo teve como objetivo preparar e caracterizar nanoemulsões de óleo essencial de *Lippia origanoides*, e analisar sua atividade antifúngica contra *C. albicans* na forma planctônica e de biofilme, além de verificar sua citotoxicidade. Nanoemulsões de alginato foram preparadas em diferentes concentrações de óleo essencial, óleo de girassol e surfactante para investigar formulações ideais quanto à sua estabilidade e eficiência antifúngica. Os resultados mostraram nanoemulsões com estabilidade superior a 60 dias, com pH ácido, tamanhos de partículas variando de 180,17±6,86 nm a 497,85±253,50 nm, potencial zeta -56,70±0,42 a -44,43±4,09, índice de polidispersidade 0,004 a 0,231. As fotomicrografias revelaram que a adição de óleo de girassol influenciou na formação das partículas, tornando-as nanoemulsões. As análises de FT-IR mostraram a presença do polissacarídeo. Os resultados antifúngicos do óleo essencial e das nanoemulsões mostraram que a CIM variou de 0,078 a 0,312 mg/mL e o CFM variou de 0,156 a 0,625. A nanoemulsão foi mais eficaz que o óleo essencial livre na erradicação do biofilme, eliminando até 89,7% de sua massa. No entanto, as nanoemulsões também foram consideradas mais citotóxicas.

Palavras-chave: Alginato de Sódio; Biofilme, Estabilidade; Óleo de Girassol; Toxicidade

ABSTRACT

Fungal infections caused by *Candida albicans* are a global public health problem. These infections are treated with antifungals, but increasingly these fungi are showing resistance to these medications, which makes their treatment difficult. Nanoemulsions based on plant essential oils have shown to be a promising alternative, increasing their solubility and bioavailability of the active compounds of essential oils, which can improve their efficacy and safety. The present study aimed to prepare and characterize nanoemulsions of *Lippia origanoides* essential oil, and analyze their antifungal activity against *C. albicans* in planktonic and biofilm form, in addition to verifying their cytotoxicity. Alginate nanoemulsions were prepared in different concentrations of essential oil, sunflower oil and surfactant to investigate ideal formulations regarding their stability and antifungal efficiency. The results showed nanoemulsions with stability greater than 60 days, with acidic pH, particle sizes ranging from 180.17 ± 6.86 nm to 497.85 ± 253.50 nm, zeta potential -56.70 ± 0.42 to -44.43 ± 4.09 , polydispersity index 0.004 to 0.231. The photomicrographs revealed that the addition of sunflower oil influenced the formation of the particles, making them nanoemulsions. FT-IR analyzes showed the presence of the polysaccharide. The antifungal results of the essential oil and nanoemulsions showed that the MIC ranged from 0.078 to 0.312 mg/mL and the CFM ranged from 0.156 to 0.625. The nanoemulsion was more effective than the free essential oil in eradicating the biofilm, eliminating up to 89.7% of its mass. However, nanoemulsions were also found to be more cytotoxic.

Keywords: Sodium Alginate, Biofilm, Stability, Sunflower oil, Toxicity.

1. INTRODUÇÃO

Candida albicans é um patógeno oportunista responsável pela maioria das infecções fúngicas de mucosas e sistêmicas, cotado ainda como responsável por causar 70% das infecções fúngicas em todo o mundo (TALAPKO *et al.*, 2021; PEREIRA *et al.*, 2021). O tratamento deste tipo de infecção, vem tornando-se progressivamente mais difícil por apresentar limitadas opções terapêuticas, além que *C. albicans* vem mostrando um perfil de tratamento cada vez mais complexo devido aos seus mecanismos de resistência e a capacidade de formação de biofilme, expressos por genes de resistência e virulência (BU *et al.*, 2022).

Nessa perspectiva, destaca-se a necessidade da busca de novas alternativas que possam ser aplicadas no combate aos microrganismos causadores das doenças infecciosas, sobretudo das infecções fúngicas (ARORA *et al.*, 2022). As plantas são fontes de princípios bioativos que as lhes conferem potencial terapêutico antifúngico, antibacteriano e antiviral (MICKYMARAY, 2019). Tais biomoléculas estão relacionadas com a biossíntese dos metabólitos secundários, que são essenciais para reprodução e defesa das plantas, dentre os quais são divididos em três categorias: alcalóides, terpenos e fenólicos (ANAND *et al.*, 2019). É importante destacar que os

produtos de origem vegetal podem variar de acordo com o método de extração empregado. Dessa forma, dependendo do método é possível obter óleos essenciais, extratos aquosos ou extratos alcoólicos com uma grande variedade de metabólitos químicos provenientes do metabolismo secundário das plantas (MELESSE; BEDANE; DONSI, 2021).

Dentre as plantas que se destacam devido suas propriedades medicinais, *Lippia origanoides* Kunth se sobressai, por seu óleo essencial apresentar amplo espectro de atividades biológicas já relatadas na literatura, inclusive sua atividade antimicrobiana (FONTENELLE *et al.*, 2007; BOTELHO *et al.*, 2007), anti-helmíntica (CARVALHO *et al.*, 2012), larvicida (LIMA *et al.*, 2013), antioxidante (NONATO *et al.*, 2022), antígeno tóxica (BRAGA *et al.*, 2019) e antiviral (MENESES *et al.*, 2009). No entanto, os óleos essenciais são sensíveis a algumas particularidades ambientais quando expostos a simples fatores externos como luz, temperatura e a presença de oxigênio, podendo comprometer sua estabilidade e conseqüentemente afetando o seu potencial biológico (TUREK; STINTZING, 2013).

Nesse entendimento, o encapsulamento das partículas oleosas na forma de nanoemulsão vem se mostrando vantajoso por aumentar a estabilidade físico-química deste tipo de extrato, além de elevar a solubilidade das nanopartículas em meio aquoso e apresentar em vários casos perfis de liberação controlada, que conseqüentemente, prolonga sua atividade no organismo (JEROBIN *et al.*, 2021; GHOSH; RANJHA; GUPTA, 2023).

As nanoemulsões podem ser caracterizadas como sistemas coloidais compostos por dois líquidos imiscíveis, o qual é estabilizado por um surfactante em escala nanométrica, e se constituem em uma boa alternativa para o carregamento de óleos essenciais, devido a sua alta afinidade proporcionada na formação de gotículas, potencializando facilmente a internalização em membranas biológicas (DEMISLI *et al.*, 2023). Este nanossistema tem sido amplamente utilizado em associação com óleos essenciais para as mais diversas aplicações. As nanopartículas deste tipo de sistema, ainda podem ser funcionalizadas com ligantes em suas superfícies externas para que se liguem a receptores expressos diferentemente a certas células ou tecidos específicos (KANEDA *et al.*, 2009).

O uso de biopolímeros utilizados na produção de nanoemulsões tem sido apontado como uma opção promissora, devido suas propriedades espessante e gelificante, além da presença de grupos funcionais aniônicos que promovem a prevenção de agregação das partículas, aumentando a repulsão eletrostática e estéricas entre as superfícies (ZANG *et al.*, 2019; ABREU *et al.*, 2012). O alginato de sódio é um polissacarídeo biopolimérico bastante difundido na produção de nanoemulsões, apresenta excelente propriedade espessante e que aumenta a viscosidade das soluções para que ocorra a dispersão das partículas oleosas do sistema, além de apresentar baixa toxicidade, boa biocompatibilidade e biodegradabilidade (PATHANIA *et al.*, 2022; CHOI *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2021).

Com isso, o objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar nanoemulsões com o óleo essencial da planta *L. origanoides* cultivada no interior do Estado do Ceará – Brasil, onde se buscou formulações ideais a partir das condições aplicadas, afim de superar problemas de instabilidades das nanoemulsões. Além de investigar as menores dosagens do óleo essencial na forma de nanoemulsão com potencial antifúngico frente a isolados clínicos de *Candida albicans* na forma planctônica e de biofilme, assim como avaliar sua toxicidade *in vitro*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção do óleo essencial de *Lippia origanoides*

2.1.1 Coleta e identificação da planta

As folhas da planta *L. origanoides* foram coletadas na região da Pedra da Andorinha, localizada no distrito de Santa Quitéria, à 87,8km de Sobral (Ceará, Brasil), 0623” S, 4822’36 W. A amostra foi encaminhada ao Herbário Professor Francisco José de Abreu Matos (HUVA) da Universidade Estadual Vale do Acaraú, onde foi autenticado e depositado um espécime comprovante (HUVA N°.23.372).

2.1.2 Extração do óleo essencial

Folhas frescas de *L. origanoides* foram higienizadas e submetidas à hidrodestilação por 2h em aparelho do tipo Clevenger modificado. O óleo foi seco sobre Na₂SO₄ anidro (~1g), filtrado e conservado em frasco lacrado a 4°C.

2.1.3 Análise dos constituintes químicos por CG-MS

A análise química dos constituintes do óleo essencial foi realizada com equipamento Shimadzu (CG-2010 Plus), com impacto de elétrons a 70 eV, coluna RTX-5MS metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, Restek), modo de injeção com divisão de fluxo 1:100, gás carreador hélio com fluxo 1,00 mL.min⁻¹, temperatura do injetor 250 °C, temperatura da linha de transferência de 250 °C e fonte de íons a 230 °C. Utilizou-se a seguinte programação no forno cromatográfico: temperatura inicial de 70 °C, com rampa de aquecimento de 4 °C.min⁻¹ até 180 °C e acréscimo de 10 °C/min até 250 °C ao término da corrida (34,5 min). A identificação dos compostos foi realizada pela análise dos padrões de fragmentação exibidos nos espectros de massa com aqueles presentes na base de dados fornecida pelo equipamento, cálculos dos índices de retenção (IR) e dados publicados na literatura (ADAMS, 2017).

2.2. Desenvolvimento das nanoemulsões

2.2.1 Materiais

Os seguintes materiais foram utilizados: Alginato de Sódio (ALG, Dynamic), Tween80®, Cloreto de Cálcio - CaCl₂ (SYNTH), Óleo de Girassol comercial (LIZA) e o Óleo Essencial obtido das folhas da planta *L. organoides*.

2.2.2 Preparação das nanoemulsões

Uma solução aquosa de alginato na concentração de 1% foi preparada previamente. Para a fase oleosa, os componentes foram devidamente pesados de acordo com cada formulação (Tabela 1) e homogeneizados em sonificador de ponteira ultrassônico (ULTRONIQUE) por 3 minutos com frequência ultrassônica de 20 Khz e potência de 160 W. Após, a fase oleosa foi vertida lentamente com auxílio de uma seringa sobre a fase aquosa sob agitação variável de 12.000 a 15.000 rpm com auxílio de agitador mecânico de alta energia (ULTRA-STIRRER), em seguida foi acrescentado lentamente a solução de Cloreto de Cálcio, seguindo sob agitação por 22.000 rpm por 5 minutos, após o preparo, foram acondicionadas em frascos e levadas a refrigerador a ± 5 °C (ABREU *et al.*, 2020; NASCIMENTO *et al.*, 2022). Foi avaliado o efeito da concentração do óleo essencial na emulsão, nos níveis 10, 5 e 2.5 mg/mL. Investigou-se para as concentrações 5 e 2.5 mg/mL o efeito do óleo de girassol na estabilidade da emulsão, bem como do espessante Cloreto de Cálcio. Manteve-se as proporções de óleo de girassol, surfactante e concentração do alginato constantes. A tabela 1 apresenta a composição dos materiais utilizados na produção das nanoemulsões.

Condições experimentais de produção de nanoemulsões de alginato com óleo essencial de *L. origanoides*.

Nanoemulsão ¹	Alginato (1%)	O. E. ² (<i>L. origanoides</i>)	O.V. ³ (Girassol)	Surfactante (Tween 80)	Espessante (CaCl ₂)
NE_10GE	90 mL	1000 mg	1500 mg	2 mL	6,5 mL
NE_5GE	100 mL	500 mg	1500 mg	2 mL	6,5 mL
NE_2.5GE	100 mL	250 mg	1500 mg	2 mL	6,5 mL
NE_5R	100 mL	500 mg	-	2 mL	6,5 mL
NE_2.5E	100 mL	250 mg	-	2 mL	6,5 mL
NE_2.5G	100 mL	250 mg	1500 mg	2 mL	-
NE_0GE	100 mL	-	1500 mg	2 mL	6,5 mL

¹Código da emulsão: o número indica a dosagem de óleo essencial, a letra G representa a presença de óleo de girassol e a letra E indica a presença de espessante Cloreto de Cálcio; ²Óleo Essencial; ³Óleo Vegetal.

2.3. Caracterização das Nanoemulsões

A estabilidade e o potencial hidrogeniônico (*pH*) das nanoemulsões foram analisados a cada 7 dias, durante 2 meses. Para a estabilidade das nanoemulsões foram determinadas medindo a extensão da separação de fase gravitacional com auxílio de um paquímetro digital (MTX), onde os valores de creme e sedimentação foram registrados e analisados a partir da razão dos volumes de creme e sedimento sobre o volume total das nanoemulsões em repouso. Para os valores de pH das amostras utilizou-se Peagâmetro Analion, modelo PM-608 (PINHEIRO *et al.*, 2021). Para investigar processos de desestabilização das nanoemulsões em escala microscópica com o surgimento de micelas, assim como sua morfologia e o modo de dispersão dos glóbulos, analisou-se 50 µL de cada formulação em microscópio óptico (ZEISS) com objetivas de 40x e 100x, após 30 dias (SIQUEIRA, 2017).

Para as medições da viscosidade relativa (η) das nanoemulsões, foram ajustadas as concentrações com água para 2,5% (v/v), 5% (v/v), 10% (v/v) e 20% (v/v), com auxílio de balão volumétrico. Após, as soluções foram depositadas em viscosímetro de Ostwald, onde cronometrou-se o tempo de escoamento de cada solução em triplicata (SANCHES, STULZER, 2010). Utilizou-se a fórmula da viscosidade relativa, conforme mostra a equação 1.

$$\eta = \frac{T}{T_0}$$

Onde: η = Viscosidade relativa, T = Tempo de escoamento da amostra e T_0 = Tempo de escoamento da água.

O Tamanho Médio de Partícula, Potencial Zeta e o Índice de Polidispersão (PDI) das nanoemulsões foram determinados após 30 dias em equipamento Malvern Zetasizer (Malvern instruments, Reino Unido), onde foram realizadas 3 medições independentes. As amostras foram devidamente diluídas em água destilada, formando uma concentração de 0,1% (v/v), que foram submetidas a agitação por 12 horas, para garantir completa dispersão da matriz em meio aquoso (BONFERONI *et al.*, 2017). A análise morfológica da fase dispersa das nanoemulsões, foi realizada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando Microscópio Phenom ProX (Modelo PW-100-017), com tensão de aceleração de 15kV-20kV e magnitude de 500x a 40.000x.

Os espectros de absorção na região do infravermelho (FT-IR) foram obtidos usando um espectrofotômetro modelo Nicolet 6700 de Thermo Scientific. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr na proporção 1:20 (m/m) (amostra: KBr) e o espectro registrado na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , usando 64 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

2.4. Sensibilidade Antifúngica das Nanoemulsões

2.4.1. Preparação do inóculo para testes de sensibilidade a antifúngicos

O inóculo foi preparado a partir de células de *C. albicans* cultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) e incubadas a 35°C por 24 horas. As colônias de leveduras foram transferidas para tubos contendo solução salina estéril para obter suspensões com turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland (10^6 UFC/mL). Estas suspensões foram então diluídas 1:2000 com meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640), suplementado com L-glutamina, com pH ajustado para 7,4 com ácido morfolinopropanossulfônico (MOPS) 0,165 mol l^{-1} (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), de acordo com as instruções do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 2008.

2.4.2. Microdiluição em Caldo

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) dos compostos contra as cepas de levedura foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo, usando placas de 96 poços de acordo com o documento CLSI M27-A3 (CLSI, 2008). Uma diluição seriada cobrindo a faixa de concentração de 0,0024-2,50 e 0,0012-1,25 mg/mL⁻¹ em meio RPMI 1640 com L-glutamina (pH 7,4) foi preparada a partir do óleo essencial e da solução estoque de nanoemulsão, respectivamente. Anfotericina B foi usado como controle padrão de drogas na faixa de 0,015–16 µg ml⁻¹.

2.4.3. Atividade Antibiofilme Pré-formado e Maduro

Os testes de viabilidade do biofilme pré-formado foram realizados pelo método de XTT (2,3-Bis-2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil-2H-Tetrazolium-5-carboxanilida). Para os ensaios de biofilme, foram utilizadas cepas de *C. albicans* das linhagens ATCC 90028 e LABMIC 0102. O inóculo foi ressuscitado em RPMI 1640 com glucose a 2% e a concentração ajustada em espectrofotômetro para 2x10⁶ UFC/mL. Dessa forma, 100 µL da suspensão fúngica foram adicionados microplaca de poliestireno de 96 poços. As células foram tratadas com 2xCIM para cada um dos compostos testados. Foram utilizado um controle com formação de biofilme e um controle tratado com anfotericina B. As placas foram incubadas por 48h/37°C. Após um período de incubação, o biofilme foi lavado 3x com solução salina para remover células planctônicas e/ou não aderentes. Para determinar a atividade metabólica, 100 µL da solução de XTT-menadiona (1 µL de XTT-menadiona 1mM em 10 mL de 0,5g/L XTT) foram adicionados aos poços de cada placa e incubados no escuro por 2h/37°C. Após esse período a solução sobrenadante foi transferida para uma nova placa e a densidade óptica medida a 490nm (PIERCE *et al.*, 2008).

O inóculo para os ensaios de biofilme maduro seguiram os mesmos princípios do pré-formando, foram colocados 100 µL da suspensão fúngica em microplaca de 96 poços e em seguida incubadas por 48h/37°C. Após esse período, os poços foram lavados 3x com solução salina, seguindo com a aplicação dos compostos testes na concentração de 2xCIM, também foram utilizados controles na formação de biofilme e controle tratado com anfotericina B, em seguida as placas foram incubadas novamente por 24h/37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas 3x com solução salina e aplicado 100 µL da solução XTT-menadione, seguindo incubada por 2h/37°C.

Após esse período, a solução sobrenadante foi transferida para uma nova microplaca, onde a densidade óptica foi medida a 490 nm.

2.5. Citotoxicidade

A citotoxicidade do óleo essencial de *L. origanoides* e das nanoemulsões NE_5GE e NE_5R, foram avaliadas utilizando células VERO de mamíferos (células epiteliais de rim de macaco verde africano) do banco de células nº 0245 do Rio de Janeiro (Brasil). As células (2×10^5 células/mL) foram cultivadas em meio Leibovitz (Cultilab, SP, BRA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 20 mg/mL de estreptomicina, 10.000 U/mL de penicilina e 1 mg/mL de anfotericina B. Em seguida, as células foram incubadas a 37°C/48h. O óleo essencial e as nanoemulsões (1mg) foram inicialmente diluídos em 1mL de meio L-15 não suplementado (970µl) e DMSO (30µl). Posteriormente foi realizada a diluição seriada nas seguintes concentrações: 15,65 µg/mL, 31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL (SILVA *et al.*, 2011; SOBRINHO *et al.*, 2021).

Após 48 horas de incubação das células, retirou-se o meio e adicionaram-se as substâncias diluídas nas concentrações pré-definidas. As placas foram incubadas por 7 dias e o experimento foi realizado em triplicata. Após esse período, o volume dos poços foi retirado e meio de cultura de células L-15 e solução de MTT (O 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio) (Sigma- Aldrich, EUA) (10 µL, 5 mg/mL) foram adicionados a cada poço. Após 4h, o volume do poço foi removido novamente, e 100 µL/poço foi adicionado de DMSO para dissolver os cristais insolúveis de formazan, sendo medido em um leitor de ELISA com comprimento de onda de 540 nm.

A porcentagem de citotoxicidade foi calculada a partir da fórmula $[A/B] \times 100$, onde A é a absorbância das células tratadas e B a absorbância das células controle. As concentrações citotóxicas de 50% (IC50) das substâncias foram estimadas a partir de curvas de efeito de concentração de regressão linear usando Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA).

2.6. Análise estatística

Os dados coletados neste estudo foram apresentados na forma de média aritmética, desvio padrão, gráficos, tabelas e imagens. Alguns dados ainda foram

submetidos as análises estatísticas utilizando o software GraphPad® Prism versão 5, 4 para Windows (GraphPad software, San Diego California USA). Adotando o nível de significância de 0,05 ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização Química do Óleo Essencial de *Lippia origanoides*

A composição dos constituintes químicos do óleo essencial e os respectivos percentuais são apresentados na Tabela 1. Foram identificados oito componentes, representando 100% do óleo total. Os componentes majoritários foram Thymol (80,02%), p-Cymene (9,68%), β -Caryophyllene (3,65%), Myrcene (3,23%) e Caryophyllene oxide (1,68%), respectivamente.

Composição química do óleo essencial de *L. origanoides*

T_r (min)	Composto	¹IRcalc	²IRlit	Área (%)
5,381	α -Pinene	935	932	0,45
6,678	Myrcene	999	988	3,23
7,639	p-Cymene	1035	1020	9,68
7,751	Eucalyptol	1039	1026	0,39
14,112	Thymol methyl ether	1252	1232	0,90
16,145	Thymol	1316	1289	80,02
20,558	β -Caryophyllene	1456	1417	3,65
25,838	Caryophyllene oxide	1635	1582	1,68
Composição Total				100.00

¹Valores de IR calculado; ²Valores de IR da literatura.

O teor de Timol (80,02%) predomina quando comparado com os outros componentes (19,98%) do óleo essencial da planta *L. origanoides*. Assim como no presente estudo, Monteiro *et al.*, 2021; Pinheiro *et al.*, 2022; e Cardoso *et al.*, 2023, também indicaram como prevalente o Timol (76,6%; 87,37%; 72,20%), seguido pelo p-Cymene (6,3%; 4,45%; 8,10%) e o β -Caryophyllene (5,00%; 3,11%; 4,90%) no óleo essencial de *L. origanoides*, corroborando os achados desta pesquisa. É relevante destacar que a composição do óleo essencial de *L. origanoides* pode variar entre si de acordo com diferenças genéticas, tipo de solo, de cultivo e do clima que essas plantas são expostas.

3.3. Caracterização das Formulações

Para avaliar a estabilidade das nanoemulsões a partir do efeito do tempo de armazenamento, foram avaliadas a formação de *creaming* (1A), sedimento (1B) e pH (1C) de cada nanoemulsão, a cada 7 dias, durante 60 dias, a viscosidade (1D) foi definida em função das diluições das nanoemulsões, conforme mostra a Figura 1.

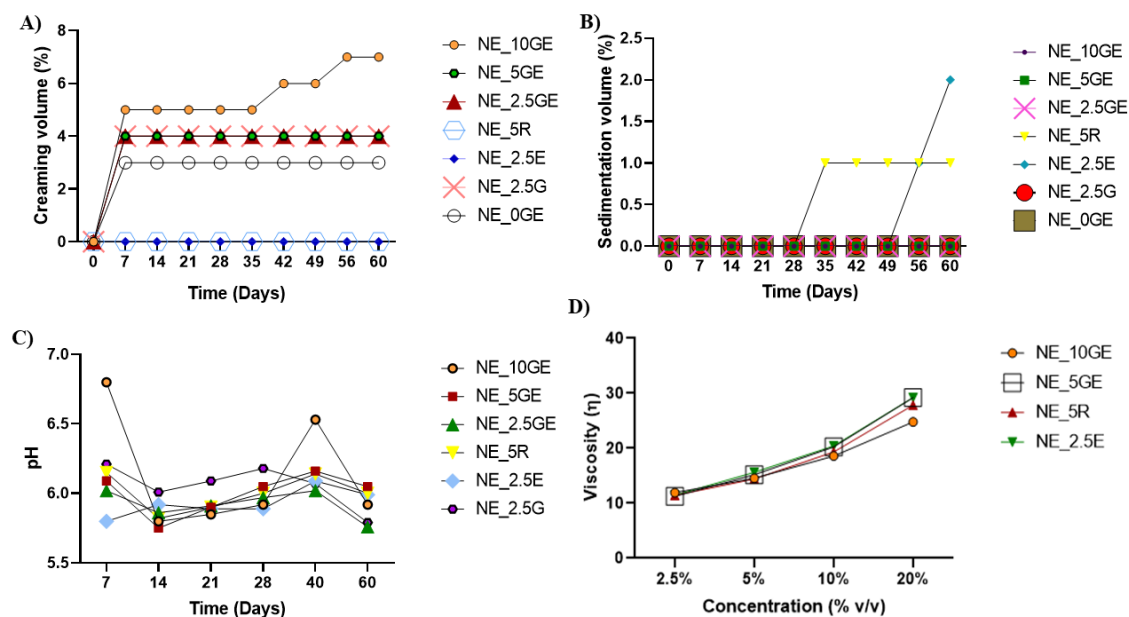


Figura 1. Análise dos parâmetros de estabilidade ((A) formação de *creaming*; (B) formação de sedimento; (C) pH) e (D) viscosidade relativa das nanoemulsões.

A formação de *creaming* ocorre devido a força gravitacional que atua sobre as gotículas de óleo nas nanoemulsões. Por essas serem menos densas que a fase contínua, tendem a se expor na superfície. A sedimentação ocorre quando as micelas das nanoemulsões são mais densas que a fase contínua (MCCLEMENTS; RAO, 2011). A maioria das amostras apresentaram índice de *creaming* (IC), exceto as amostras sem a adição do óleo de girassol (NE_5R e NE_2.5E) como pode ser analisado na Figura 1A. A amostra com maior IC foi a NE_10GE, por possuir uma maior quantidade de óleo essencial de *L. origanoides*, indicando que existe um excesso de fase oleosa no meio, somente esta amostra apresentou aumento no volume de *creaming* em todo período analisado, sendo a menos estável. Foi observado 1% de sedimentação (Figura 1B) a partir do 28º dia para a amostra NE_5R e a partir do 49º para a amostra NE_2.5E, que não possui como componente o óleo de girassol na sua constituição. A presença de óleo

vegetal influenciou a formação de *creaming*. Resultados semelhantes foram encontrados por Abreu *et al.*, (2022) ao avaliarem a estabilidade de nanoemulsões produzidas com matrizes poliméricas de alginato e quitosana em diferentes composições oleosas por 60 dias. Os resultados mostraram que as nanoemulsões produzidas com alginato apresentaram menor volume de *creaming* quando comparadas às produzidas com quitosana, com percentual de perda inferior a 2,5%, o que atende aos critérios de estabilidade.

Os resultados das medições de pH (Figura 1C) para as formulações das nanoemulsões revelaram valores de pH ácido ($<7,0$), ocorrendo variações com o passar do tempo. As medições do pH mostraram que quanto maior for o tempo de armazenamento, menor será o valor do pH. Resultados semelhantes foram encontrados por Melo *et al.*, (2022) para nanoemulsões de óleo essencial de *L. origanoides* formuladas com o agente emulsionante Procetyl, produzidas pelo método de emulsificação espontânea. Esta diminuição é ocasionada por diversos fatores como a decomposição da gordura devido sua hidrólise, oxidação pela influência da luz que contribui para a redução do pH (PARAMITA *et al.*, 2022).

As amostras apresentaram viscosidade (η) (Figura 1D) semelhantes, pois todas foram produzidas com alginato de sódio. O papel do polissacarídeo é estabilizar os movimentos das partículas no sistema, por meio da alta viscosidade causando resistência (MAPHOSA; JIDEANI, 2018). Nascimento *et al.*, (2020) observaram que nanoemulsões de alginato de sódio com óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* com viscosidade relativa mais alta apresenta maior estabilidade e tempo de vida. A viscosidade é um parâmetro importante para a caracterização física das nanoemulsões. O diâmetro das partículas oleosas dispersas afeta sua viscosidade, onde quanto maior for o diâmetro das partículas maior a viscosidade o que poderá ser confirmado nas análises seguintes (YAZGAN, 2020).

Com objetivo de observar possíveis efeitos de instabilidade em escala microscópica após 30 dias, foram selecionadas amostras com base nos resultados obtidos nos testes de estabilidade macroscópica para análise de microscopia óptica. A figura 2 apresenta imagens das nanoemulsões NE_5GE e NE_5R, onde é possível observar a distribuição das gotículas da dispersão.

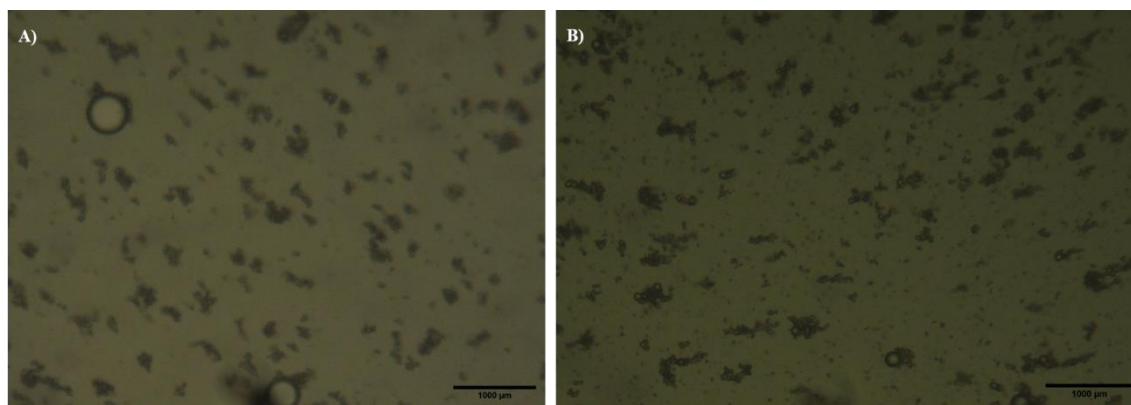


Figura 2. Análise de microscopia óptica das amostras: A) NE_5GE; e B) NE_5R.

Através da análise da microscopia óptica (Figura 2B) é possível destacar que a amostra NE_5R apresentou a maioria dos domínios semelhantes em relação aos seus tamanhos. A amostra NE_5GE (Figura 1B) possui domínios heterogêneos em relação aos seus tamanhos. Ambas as amostras possuem domínios com formação de aglomerados, chamados de floculação, o que futuramente poderá ocasionar o fenômeno de coalescência (RAHN-CHIQUE *et al.*, 2012).

As nanoemulsões apresentaram variação considerável nos valores de tamanho médio das partículas e PDI, onde a adição do óleo de girassol e Cloreto de Cálcio ocasionaram a redução otimizada dessas partículas. A tabela 2 descreve os valores de tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão.

Tamanho de Partícula, Potencial Zeta e Índice de Polidispersão de nanoemulsões produzidas

Nanoemulsão	Tamanho de Partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)	PDI
NE_10GE	180.17±6.86	-56.70±0.42	0.013
NE_5GE	182.20±5,6	-60.47±2.25	0.004
NE_5R	475.25±34,01	-50.67±2.99	0.498
NE_2.5E	497.85±253.50	-44.43±4.09	0.231

As amostras NE_10GE e NE_5GE apresentaram menores tamanhos de partículas, diferentes das amostras NE_5R e NE_2.5E com tamanhos superiores a 400 nm. As amostras com menores diâmetros tiveram a adição do óleo vegetal de girassol e

Cloreto de Cálcio, o que influenciou na ocorrência de nanoemulsões de tamanhos inferiores a 200 nm. Seus valores de potencial zeta são considerados ótimos para assegurar sua estabilidade, pois os valores são ± 30 mV (GURPREET; SINGH, 2018). Os valores do índice de polidispersão demonstram perfil de homogeneidade das nanoemulsões, pois quanto mais inferior de 1,0 melhor, revelando-se a amostra NE_5R menos homogênea.

O estudo de Asadinezhad *et al.*, (2019) ao analisarem diferentes parâmetros no tamanho de partícula e Índice de Polidispersão de nanoemulsões contendo diferentes proporções de óleo essencial de laranja para óleo de girassol e surfactante (Tween 80), obtidas por agitação em alta velocidade utilizando um Ultra Turrax T25 por 24,000 rpm por 5min, constataram quando o nível de óleo de girassol da fase oleosa foi reduzido de 50% para 30% em peso, houve uma diminuição do diâmetro médio das partículas (303,33 para 176,66 nm) e no índice de polidispersão (0,65 para 0,52), onde foi atribuído tal efeito à diminuição da viscosidade e da tensão interfacial da fase dispersa com a fase contínua devido à diminuição do teor do óleo de girassol, já quando houve um declínio maior para 10% em peso a amplitude das partículas aumentaram sensivelmente de 176,66 para 196,66 nm e de 0,52 para 0,6, mostrando que o conteúdo do óleo de girassol da fase oleosa não é suficiente para inibir o amadurecimento de Ostwald das gotículas recém-formadas. Isso mostra que para obter o menor tamanho de partículas, existe uma proporção crítica de óleo insolúvel para a fase dispersa que depende de diferentes fatores como volume de massa da fase dispersa, tensão interfacial e polaridade e solubilidade, fenômenos semelhantes foram relatados por Chang & McClements (2014).

Para obter informações em escala micrométrica sobre as inclusões esféricas, tais como as partículas agregadas à rede polimérica da amostra e sua morfologia, utilizou-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A figura 3 apresenta as fotomicrográficas obtidas por MEV das amostras NE_5GE e NE_5R enriquecidas com óleo essencial de *L. origanoides*.

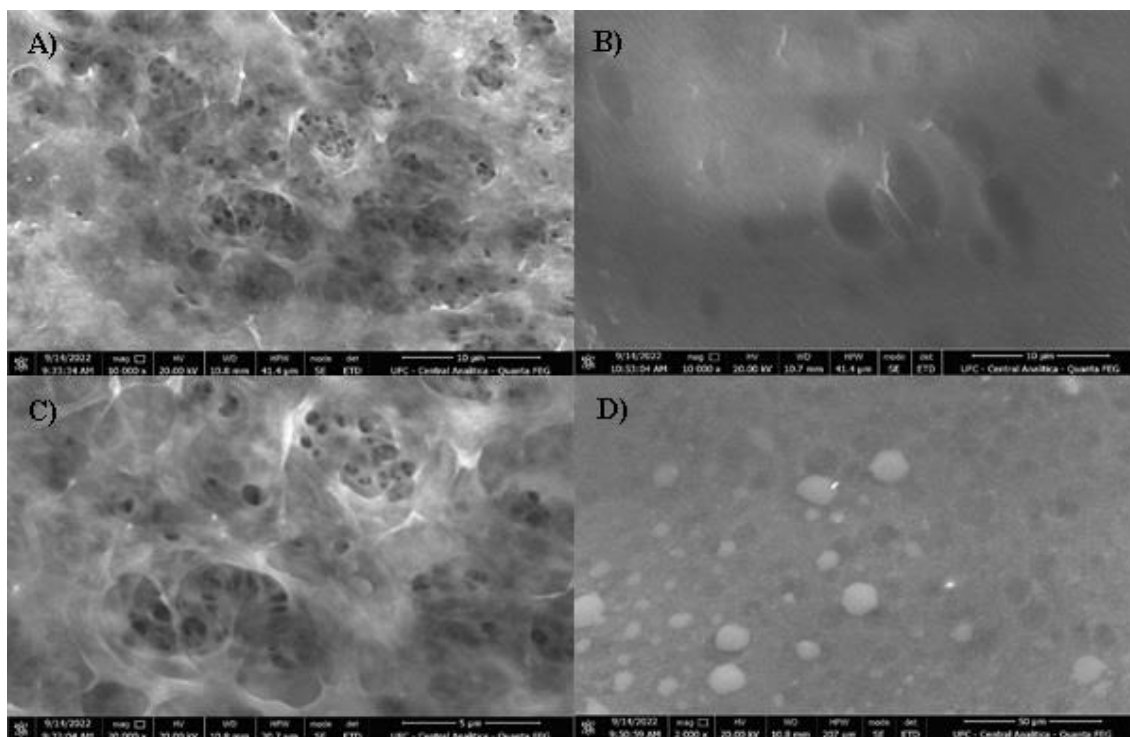


Figura 3. Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície de nanoemulsões de Alginato com óleo essencial da planta *L. origanoides* na concentração de 5 mg/mL com (NE_5GE) e sem (NE_5R) presença de óleo vegetal. A) NE_5GE com aumento de 10,000x. B) NE_5R com aumento de 10,000x. C) NE_5GE com aumento de 20,000x. D) NE_5R com aumento de 2,000x.

Ao analisar as imagens, é possível observar diferenças nas características das partículas presentes nas amostras. Na fotomicrografia 3A, correspondente à amostra NE_5GE, é perceptível que as lacunas das partículas oleosas apresentam um tamanho menor em comparação com as lacunas das partículas observadas na fotomicrografia 3B, correspondente à amostra NE_5R. Essa diferença de tamanho das lacunas das partículas oleosas é um indício de que a amostra NE_5GE é uma nanoemulsão, enquanto a NE_5R é uma microemulsão. As nanoemulsões consistem em sistemas dispersos em escala nanométrica, com partículas de tamanho reduzido, enquanto as microemulsões apresentam partículas de tamanho maior. Ao observar a imagem 3C, onde a nanoemulsão NE_5GE foi ampliada 20,000x e a NE_5R apenas 5,000x, pode-se notar que a NE_5GE apresenta um menor domínio das partículas. Isso significa que as partículas na NE_5GE estão mais dispersas, formando aglomerados menores e menos coesos, enquanto na NE_5R as partículas estão mais agrupadas, resultando em aglomerados maiores e mais densos.

Essas diferenças nas características das partículas e na organização da nanoemulsão versus microemulsão podem influenciar em várias propriedades desses sistemas, como estabilidade, eficiência de encapsulamento, liberação controlada de substâncias ativas, entre outros aspectos relevantes em aplicações farmacêuticas. Em suma, as fotomicrografias obtidas por meio do MEV fornecem informações valiosas sobre as características das partículas presentes nas nanoemulsões NE_5GE e NE_5R, evidenciando que o óleo de girassol influenciou diretamente na formação das partículas agindo como agente estabilizador.

As análises de FT-IR objetiva rastrear grupos funcionais das substâncias utilizadas no preparo das nanoemulsões. O espectro das nanoemulsões NE_5GE e NE_5R, estão representados na Figura 4, onde relevou absorções características para o alginato, componente externo da nanoemulsão.

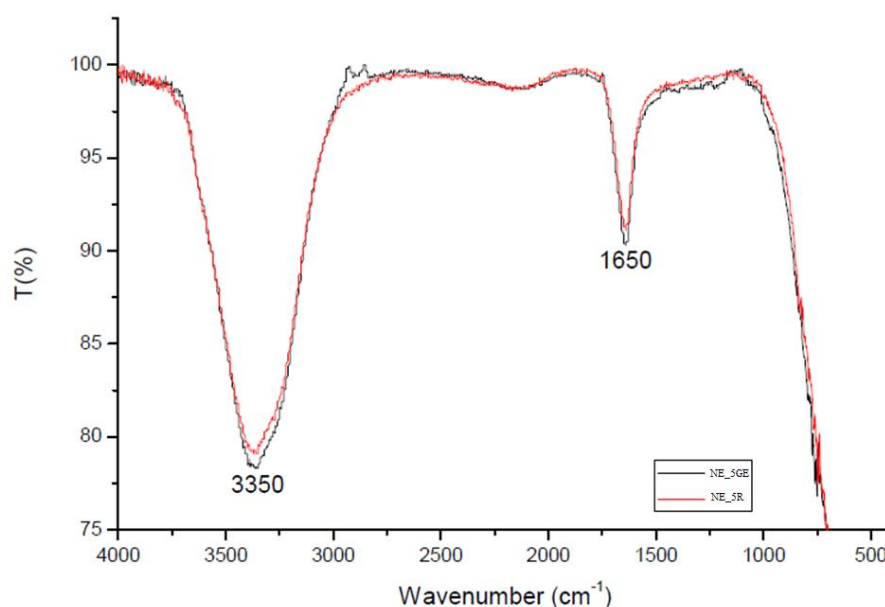


Figure 4. FTIR spectra of NE_5GE and NE_5R.

As amostras foram preparadas com alginato de sódio por esse motivo as bandas das nanoemulsões são semelhantes contendo os grupos funcionais de álcool ($-OH$) com as bandas características próximas a 3400 cm^{-1} . As moléculas orgânicas de timol presentes poderiam ser identificadas por impressão digital nas bandas de absorção de vibrações correspondentes a $C=O$ derivadas de flavonóides sendo identificadas na faixa de 1650 e 1830 cm^{-1} (ADINEW, 2014; WU *et al.*, 2012; BAÑUELOS-VALENZUELA *et al.*, 2018).

3.9. Atividade Antifúngica

Todas as formulações foram inicialmente testadas quanto seu efeito antifúngico pelo método de microdiluição em caldo, exibe-se na Tabela 4 as nanoemulsões que apresentaram efeito inibitório. A amostra controle da nanoemulsão (sem óleo essencial) não apresentou efeito antifúngico. As CIMs para as cepas patogênicas de *C. albicans* ($n = 5$) frente ao óleo essencial livre e a nanoemulsão NE_5GE variou de 0,078 a 0,312 mg/mL e MFCs variou 0,156 a 0,625 mg/mL. Para a nanoemulsão NE_5R as CIMs variaram de 0,078 a 0,156 mg/mL e MFCs variou 0,156 a 0,625 mg/mL.

Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima de Nanoemulsões e Óleo Essencial de *L. origanoides* contra *Candida albicans*

CEPAS (<i>C. albicans</i>)	O.E.* (<i>L. origanoides</i>)		NE_5GE		NE_5R		AmB**	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL		
ATCC (90028)	0,078	0,312	0,078	0,625	0,156	0,156	1 µg/mL	
LABMIC 0102	0,078	0,156	0,156	0,156	0,156	0,156	1 µg/mL	
LABMIC 0104	0,078	0,312	0,156	0,312	0,156	0,625	1 µg/mL	
LABMIC 0105	0,078	0,156	0,312	0,625	0,078	0,312	1 µg/mL	
LABMIC 0128	0,312	0,625	0,312	0,625	0,078	0,312	0,25 µg/mL	

*Óleo Essencial; **Anfotericina B.

O óleo essencial de *L. origanoides* livre apresentou os menores valores de CIM e CFM para a grande maioria das cepas testadas. No entanto, as nanoemulsões testadas também foram eficazes contra *C. albicans*. Isso demonstra que os sistemas produzidos são promissores, pois são capazes de estabilizar e aumentar a dispersibilidade em água do óleo essencial, tornando-o adequado para uso como agente natural em preparações antifúngicas. A nanoemulsão NE_5R apresentou melhor desempenho antifúngico do que a nanoemulsão NE_5GE. Isso sugere que a adição de óleo de girassol pode ter afetado a concentração do ativo. Baldim *et al.*, (2019) também encontraram resultados semelhantes ao investigarem a sensibilidade *in vitro* de *C. albicans* ao óleo essencial de *L. origanoides* nanoencapsulado. Os autores observaram que a composição das nanoformulações não afetou as concentrações fungistática e

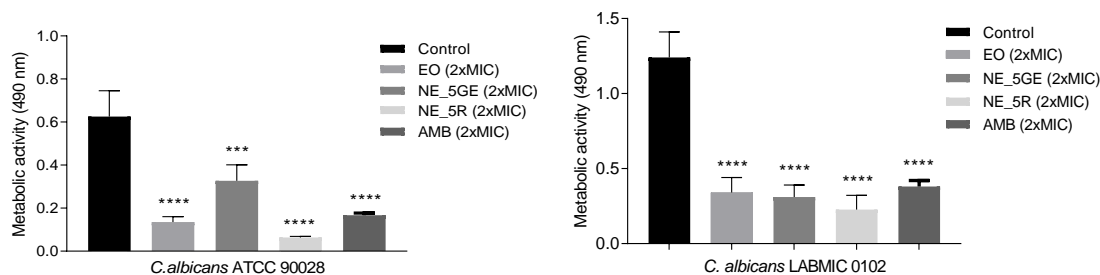
fungicida mínima. Além disso, o óleo essencial livre apresentou menores dosagens de inibição do que a forma encapsulada, o que corrobora os achados desta pesquisa.

Evidências já foram relatadas na literatura do potencial antifúngico do óleo essencial de *L. origanoides* contra *C. albicans* (BRITO et al., 2015; BATISTA et al., 2013). Em seus trabalhos, Fontenelle et al., (2007) relataram dosagens superiores às encontradas nesta pesquisa. No entanto, eles também mencionaram que é difícil comparar os resultados de diferentes estudos, pois a composição dos óleos essenciais pode variar de acordo com a região geográfica, variedade, idade da planta, método de secagem e método de extração. Essas variações podem afetar o potencial antifúngico dos óleos essenciais.

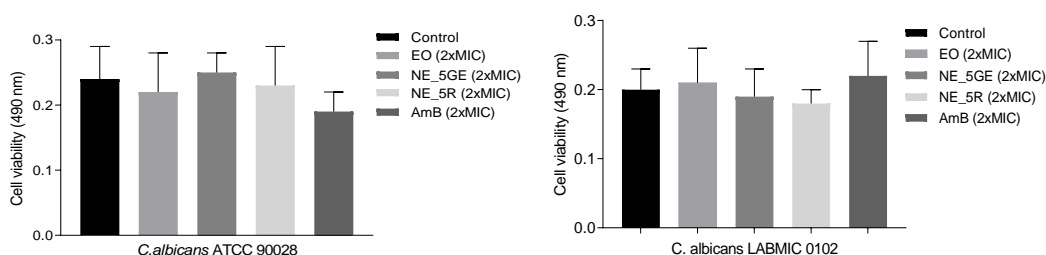
3.10. Atividade antibiofilme

C. albicans possui capacidade de formar biofilme com presença de polimorfismo, apresentando além da forma leveduriforme, a presença de hifas e pseudohifas. Essas comunidades microbianas estão envolvidas em aproximadamente 65% de todas as infecções em humanos (ATRIWAL et al., 2021). Além disso, os biofilmes fúngicos são amplamente resistentes aos medicamentos antifúngicos disponíveis (GULATI; NOBILE, 2016; XU et al., 2022). Diante disso é importante investigar o potencial de novas drogas antimicrobianas que possuam potencial antibiofilme.

As nanoemulsões e o óleo essencial livre foram testados para avaliar a inibição da adesão do biofilme fúngico e do biofilme maduro pré-formado. Para isso foi utilizado o método do XTT, que quantifica indiretamente células viáveis através da conversão do sal tetrazólico (XTT) em cristais de formazan pela ação de enzimas desidrogenase presente em células de leveduras viáveis. Os compostos foram testados na concentração de 2xCIM. A figura 5 e 6 mostram os achados do potencial de inibição desses produtos contra a inibição da adesão do biofilme pré-formado e maduro, respectivamente.



Efeito do óleo essencial e nanoemulsões de *L. origanoides* contra biofilme de *C. albicans* de adesão. Bars represent mean \pm standard deviation. ***p<0.001 and ****p<0.0001 compared to the control (Biofilm without treatment).



Efeito do óleo essencial e nanoemulsões *L. origanoides* contra *C. albicans* biofilme maduro.

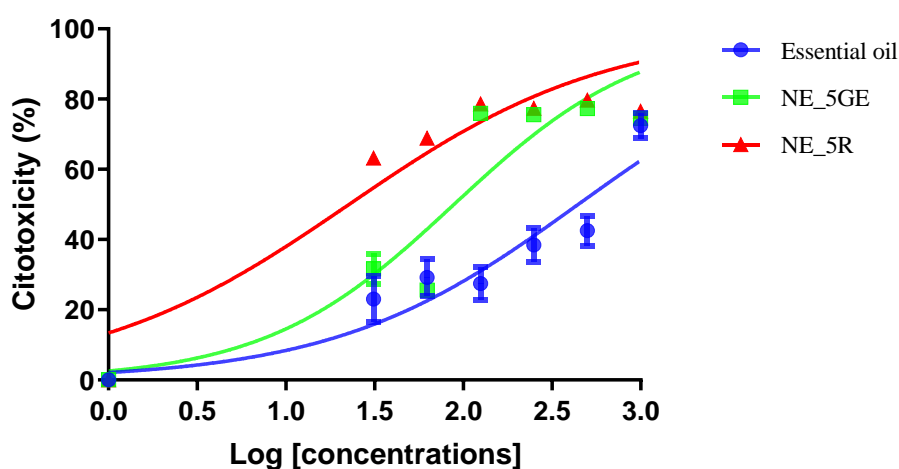
As cepas ATCC 90028 e LABMIC 0102 apresentaram redução do biofilme em 78,4% e 72,6%, respectivamente. NE_5GE apresentou atividade semelhante ao óleo essencial livre contra inibição da adesão do biofilme da cepa de isolado clínico com redução de 75%, enquanto que a cepa padrão já apresentou uma menor redução com 48% de inibição das células viáveis. Em contrapartida a NE_5R apresentou-se mais efetiva que a NE_5GE com redução de 89,7 e 81,7% para cepa ATCC 90028 e LABMIC 0102, respectivamente. Resultados semelhantes foram relatados por Giongo *et al.*, (2016) e Gündel *et al.*, (2018), que mostraram que nanoemulsões de óleo essencial foram mais eficazes na redução do biofilme de *C. albicans* que o óleo livre. A adesão é o primeiro estágio de formação do biofilme. Nessa fase os microrganismos vão aderir à superfície através de ligações iônicas e hidrofóbicas, ou ainda usar enzimas de adesão para se ligar a receptores nas células do hospedeiro (XU *et al.*, 2022). Esse estágio depende, portando, das características da superfície de adesão que ocorra a aderência das células. Tanto o óleo essencial como as nanoemulsões podem afetar essas características inibindo entre 48 a 89,7% da adesão do biofilme de *C. albicans*.

No biofilme maduro pré-formado nenhum dos compostos apresentou redução significativamente estatística das células viáveis em relação ao controle sem tratamento. Depois do biofilme formado, a CIM de *C. albicans* é aumentada de 30 a

20.000 vezes em comparação com as células planctônicas (XU *et al.*, 2022). É importante destacar que avaliamos concentrações seguras dos compostos contra o biofilme, por isso concentrações de até 30 vezes a CIM não foram levadas em consideração.

3.2. Citotoxicidade

Para investigar da citotoxicidade do óleo essencial e das formulações, os poços foram tratados por 7 dias para avaliar as possíveis concentrações tóxicas. A figura 7 ilustra os dados encontrados.



Atividade de citotoxicidade do óleo essencial e nanoemulsões de *L. origanoides* $IC_{50}_{[EO]} = 444.2 \mu\text{g/mL}$; $IC_{50}_{[NE_5GE]} = 88.68 \mu\text{g/mL}$; $IC_{50}_{[NE_5R]} = 22.72 \mu\text{g/mL}$.

As nanoemulsões de *L. origanoides* apresentaram IC_{50} maiores do que o óleo essencial livre em células VERO. O óleo livre apresentou IC_{50} 5 vezes maior que a nanoemulsão NE_5GE e 20 vezes maior que a nanoemulsão NE_5R. A nanoemulsão NE_5R apresentou IC_{50} 4 vezes menor que a NE_5GE, indicando maior toxicidade. Hertiani *et al.*, (2019) também encontraram IC_{50} maior para nanoemulsão quando comparada a forma livre do óleo essencial de massóia, indicando que a nanoemulsão contendo óleo essencial de massóia é mais tóxica para células VERO do que o óleo não formado, onde atribuíram que formulações de nanoemulsões facilita a biodisponibilidade partículas menores dentro das células alvo, e que conseqüentemente podem causar maior toxicidade com o aumento da eficácia de entrega.

CONCLUSÃO

Nanoemulsões de alginato contendo óleo essencial de *Lippia origanoides* foram produzidas, foi possível evidenciar que nanoemulsões com teor de óleo essencial de *L. origanoides* abaixo de 5 mg/mL não apresentaram potencial antifúngico contra *Candida albicans*. A presença do óleo de girassol tornou as nanoemulsões favoráveis a formação de *creaming*, mas que o fez essencial para estabilizar as partículas inclusas ao agregado da rede polimérica, tornando-as menores e de morfologia mais adequada. Para os resultados dos testes antifúngicos contra *C. albicans* na forma planctônica e de biofilme, foi possível constatar que as nanoemulsões apresentaram a CIM igual/maior quando comparado ao óleo essencial livre, para os valores da CFM a nanoemulsão NE_5R se destacou, por apresentar menores concentrações para a maioria das cepas testadas quando comparado a forma livre do óleo essencial. Para a redução da massa de biofilmes de modo pré-formado e maduro, a nanoemulsão NE_5R também se sobressaiu, apresentando a potencialização do efeito antifúngico do óleo essencial.

REFERÊNCIAS

- Abreu, F. O. M. D. S., Costa, E. F., Cardial, M. R. L., & André, W. P. P. (2020). Polymeric nanoemulsions enriched with *Eucalyptus citriodora* essential oil. *Polímeros*, 30. <<https://doi.org/10.1590/0104-1428.00920>>
- Abreu, F. O. M. D. S., Nascimento, J. F., Holanda, T., Castelo, R. M., Valério, R. B. R., Forte, M. M. C. (2022). Influence of matrix type and oil phase composition on the stability of polysaccharide-based nanoemulsions. *Polymer Science: Peer Review Journal V* (4), p. 1-4, 2022. <<https://doi.org/10.31031/PSPRJ.2022.04.000592>>
- Abreu, F. O., Oliveira, E. F., Paula, H. C., & de Paula, R. C. (2012). Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydrate polymers*, 89(4), 1277-1282. <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.048>>
- Adams, R. P. (2017) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. *Texensis Publishing*.
- Adinew, Bizuneh (2014). GC-MS and FT-IR analysis of constituents of essential oil from Cinnamon bark growing in South-west of Ethiopia. *International Journal of Herbal Medicine*, v. 1, n. 6, p. 22-31.
- Anand, U., Jacobo-Herrera, N., Altemimi, A., & Lakhssassi, N. (2019). A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. *Metabolites*, 9(11), 258. <<https://doi.org/10.3390/metabo9110258>>
- Arora, H., Sharma, A., Poczai, P., Sharma, S., Haron, F. F., Gafur, A., & Sayyed, R. Z. (2022). Plant-derived protectants in combating soil-borne fungal infections in tomato and chilli. *Journal of fungi*, 8(2), 213. BAÑUELOS-VALENZUELA, Rómulo et al. Composición química y FTIR de extractos etanólicos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. *Agrociencia*, v. 52, n. 3, p. 309-321, 2018. <<https://doi.org/10.3390/jof8020213>>

- Asadinezhad, S., Khodaiyan, F., Salami, M., Hosseini, H., & Ghanbarzadeh, B. (2019). Effect of different parameters on orange oil nanoemulsion particle size: combination of low energy and high energy methods. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *13*, 2501-2509. <<https://doi.org/10.1007/s11694-019-00170-z>>
- Atriwal, T., Azeem, K., Husain, F. M., Hussain, A., Khan, M. N., Alajmi, M. F., & Abid, M. (2021). Mechanistic understanding of *Candida albicans* biofilm formation and approaches for its inhibition. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 638609. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.638609>>
- Baldirim, I., Tonani, L., von Zeska Kress, M. R., & Oliveira, W. P. (2019). *Lippia sidoides* essential oil encapsulated in lipid nanosystem as an anti-Candida agent. *Industrial Crops and Products*, *127*, 73-81. <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.064>>
- Batista, R. S. A., de Souza Silva, G., & Feitosa, S. E. (2013). Atividade antifúngica de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre. *Revista AGROTEC*–v, *34*(1), 40-49.
- Bonferoni, M. C., Sandri, G., Rossi, S., Usai, D., Liakos, I., Garzoni, A., ... & Ferrari, F. (2017). A novel ionic amphiphilic chitosan derivative as a stabilizer of nanoemulsions: Improvement of antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* essential oil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *152*, 385-392. <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.043>>
- Botelho, M. A., Nogueira, N. A. P., Bastos, G. M., Fonseca, S. G. C., Lemos, T. L. G., Matos, F. J. A., ... & Brito, G. A. C. (2007). Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *40*, 349-356. <<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2007000300010>>
- Braga, M. A., et al. (2019). Prospecção de moduladores enzimáticos em extratos aquosos e etanólicos de folhas de *Lippia sidoides*: genotoxicidade, digestão, inflamação e hemostasia. *Química & Biodiversidade*, v. 16, n. 3, pág. e1800558, 2019.
- Brito, D. I. V., Morais-Braga, M. F. B., Cunha, F. A. B., Albuquerque, R. S., Carneiro, J. N. P., Lima, M. S. F., ... & Coutinho, H. D. M. (2015). Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, *17*, 836-844. <https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_060>
- Bu, Q. R., Bao, M. Y., Yang, Y., Wang, T. M., & Wang, C. Z. (2022). Targeting Virulence Factors of *Candida albicans* with Natural Products. *Foods*, *11*(19), 2951. <<https://doi.org/10.3390/foods11192951>>
- Cardoso, L., Owatari, M. S., Chaves, F. C. M., Furtado, W. E., Honorato, L. A., Agnes, J. P., ... & Martins, M. L. (2023). *Lippia sidoides* essential oil (Verbenaceae) improves inflammatory response and histological condition in Danio rerio. *Aquaculture International*, 1-21. <<https://doi.org/10.1007/s10499-023-01103-w>>
- Carvalho, C. O., et al. (2012). The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Veterinary parasitology*, v. 183, n. 3-4, p. 260-268. <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.051>>
- Chang, Y., McClements, D. J. (2014). Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: influence of the oil phase, surfactant, and

temperature. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(10), 2306-2312. <<https://doi.org/10.1021/jf500160y>>

Choi, Y., Jang, J., Koo, H. J., Tanaka, M., Lee, K. H., & Choi, J. (2021). Alginate-chitosan hydrogel patch with beta-glucan nanoemulsion for antibacterial applications. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 26, 71-77. <<https://doi.org/10.1007/s12257-020-0177-4>>

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, (2008) 3rd ed.; CLSI Document M27-A3; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA.

Demisli, S., Galani, E., Goulielmaki, M., Kyrilis, F. L., Ilić, T., Hamdi, F., ... & Papadimitriou, V. (2023). Encapsulation of cannabidiol in oil-in-water nanoemulsions and nanoemulsion-filled hydrogels: A structure and biological assessment study. *Journal of Colloid and Interface Science*, 634, 300-313. <<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.12.036>>

Fontenelle, R. O. S. et al. (2007). Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 59, n. 5, p. 934-940. <<https://doi.org/10.1093/jac/dkm066>>

Ghosh, V., Ranjha, R., & Gupta, A. K. (2023). Polymeric encapsulation of anti-larval essential oil nanoemulsion for controlled release of bioactive compounds. *Inorganic Chemistry Communications*, 150, 110507. <<https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.1>>

Giongo, J. L., de Almeida Vaucher, R., Fausto, V. P., Quatrin, P. M., Lopes, L. Q. S., Santos, R. C. V., ... & Steppe, M. (2016). Anti-Candida activity assessment of Pelargonium graveolens oil free and nanoemulsion in biofilm formation in hospital medical supplies. *Microbial pathogenesis*, 100, 170-178. <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.013>>

Gulati, M., & Nobile, C. J. (2016). *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and infection*, 18(5), 310-321. <<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002>>

Gündel, S. S., de Souza, M. E., Quatrin, P. M., Klein, B., Wagner, R., Gündel, A., ... & Ourique, A. F. (2018). Nanoemulsions containing Cymbopogon flexuosus essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. *Microbial pathogenesis*, 118, 268-276. <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.043>>

Gurpreet, K., & Singh, S. K. (2018). Review of nanoemulsion formulation and characterization techniques. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(5).

Hertiani, T., Tunjung Pratiwi, S. U., Haryadi, E. C., Triatmoko, B., Yuswanto, A., & Martien, R. (2019). Evaluation of the efficacy and toxicity of massoia oil nanoemulsion. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(4).

Jerobin, J., Sureshkumar, R. S., Anjali, C. H., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2012). Biodegradable polymer based encapsulation of neem oil nanoemulsion for controlled release of Aza-A. *Carbohydrate polymers*, 90(4), 1750-1756. <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.064>>

- Kaneda, M. M., Caruthers, S., Lanza, G. M., & Wickline, S. A. (2009). Perfluorocarbon nanoemulsions for quantitative molecular imaging and targeted therapeutics. *Annals of biomedical engineering*, 37, 1922-1933. <<https://doi.org/10.1007/s10439-009-9643-z>>
- Li, D., Wei, Z., & Xue, C. (2021). Alginate-based delivery systems for food bioactive ingredients: An overview of recent advances and future trends. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(6), 5345-5369. <<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12840>>
- Lima, G. P. G. et al. (2013). Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti* L. *Parasitology Research*, v. 112, n. 5, p. 1953-1958. <<https://doi.org/10.1007/s00436-013-3351-1>>
- Maphosa, Y., & Jideani, V. A. (2018). Factors affecting the stability of emulsions stabilised by biopolymers. *Science and technology behind Nanoemulsions*, 65.
- McClements, D. J., Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(4), 285-330. <<https://doi.org/10.1080.10408398.2011.559558>>
- Melesse, T. Y., Bedane, T. F., & Donsì, F. (2021). Plant Secondary Metabolites: Commercial Extraction, Purification, and Health Benefits. In *Plant-Based Functional Foods and Phytochemicals: From Traditional Knowledge to Present Innovation* (pp. 281-309). CRC Press.
- Melo, J. O., Blank, A. F., de Souza Nunes, R., Alves, P. B., de Fátima Arrigoni-Blank, M., Gagliardi, P. R., ... & de Castro Nizio, D. A. (2022). Essential oils of *Lippia gracilis* and *Lippia sidoides* chemotypes and their major compounds carvacrol and thymol: nanoemulsions and antifungal activity against *Lasiodiplodia theobromae*. *Research, Society and Development*, 11(3), e36511326715-e36511326715. <<https://doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26715>>
- Meneses, Rocío et al. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication *in vitro*. (2009). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 8, n. 1, p. 1-6.
- Mickymaray, S. (2019). Efficacy and mechanism of traditional medicinal plants and bioactive compounds against clinically important pathogens. *Antibiotics*, 8(4), 257. <<https://doi.org/10.3390/antibiotics8040257>>
- Monteiro, P. C., Majolo, C., Chaves, F. C. M., Bizzo, H. R., Almeida O'Sullivan, F. L., & Chagas, E. C. (2021). Antimicrobial activity of essential oils from *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum* and *Zingiber officinale* against *Aeromonas* spp. *Journal of Essential Oil Research*, 33(2), 152-161. <<https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1848653>>
- Nascimento, J. F., da Costa, E. F., & da Silva Abreu, F. O. M. (2020). Caracterização de nanoemulsões de alginato de sódio com óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*. *Revista Coleta Científica*, 4(8), 15-22. <<https://doi.org/10.7910/DVN/7QGVTR>>
- Nascimento, J. F.; Holanda, T.; Castelo, R. M.; Valério, R. B. R.; Abreu, F. O. M. da S. (2020). Influence of Matrix Type and oil plase composition on the Stability of Polysaccharide- Based Nanoemulsions. *Polymer Science: Peer Review Journal*. V.4, p. 1 – 4, 2022. <<http://doi.org/10.31031/PSPRJ.2022.04.000592>>

Nonato, Carla de Fatima Alves et al. Comparative analysis of chemical profiles and antioxidant activities of essential oils obtained from species of *Lippia* L. by chemometrics. (2022). *Food Chemistry*, v. 384, p. 132614. <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132614>>

Paramita, V., Ariyanto, H. D., Pramudono, B., Yoshii, H., Kusumayanti, H., & Amalia, R. (2022). Effect of α -cyclodextrin and surfactants on stability nanoemulsion system of medium chain triglyceride (MCT). *Materials Today: Proceedings*, 63, S333-S338. <<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.03.160>>

Paramita, Vita et al. (2022). Effect of α -cyclodextrin and surfactants on stability nanoemulsion system of medium chain triglyceride (MCT). *Materials Today: Proceedings*, v. 63, p. S333-S338. <<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.03.160>>

Pathania, R., Najda, A., Chawla, P., Kaushik, R., & Khan, M. A. (2022). Low-energy assisted sodium alginate stabilized *Phyllanthus niruri* extract nanoemulsion: Characterization, in vitro antioxidant and antimicrobial application. *Biotechnology Reports*, 33, e00711. <<https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00711>>

Pereira, R., Fontenelle, R. O. S., De Brito, E. H. S., & De Moraes, S. M. (2021). Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 131(1), 11-22. <<https://doi.org/10.1111/jam.14949>>

Pierce, C. G., Uppuluri, P., Tristan, A. R., Wormley Jr, F. L., Mowat, E., Ramage, G., & Lopez-Ribot, J. L. (2008). A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature protocols*, 3(9), 1494-1500. <<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.141>>

Pinheiro, H. N., Costa, E. F., Abreu, F. O. M. S. (2021). Síntese e caracterização de nanoemulsões poliméricas de goma xantana e goma arábica encapsulantes de óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* l. *Ambiente: Gestão e Desenvolvimento*. <<https://doi.org/10.24979/ambiente.v1i1.929>>

Pinheiro, L. G., dos Santos Fontenelle, R. O., Rodrigues, T. H. S., Pinto, V. D. P. T., & Barbosa, F. C. B. (2022). Inhibitory and bactericidal activities of *Lippia origanoides* essential oil against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* multidrug resistant. *Research, Society and Development*, 11(9), e6811931478-e6811931478. <<https://doi.org/10.33448/rsd-v11i9.31478>>

Rahn-Chique, K., Puertas, A. M., Romero-Cano, M. S., Rojas, C., & Urbina-Villalba, G. (2012). Nanoemulsion stability: experimental evaluation of the flocculation rate from turbidity measurements. *Advances in colloid and interface science*, 178, 1-20. <<https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.05.001>>

Sanches, Anelise Russo; STULZER, Hellen Karine. (2010). Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões contendo o antiviral Acyclovir. *Anais do XIX EAIC-UNICENTRO*.

Silva, A. R. A., Moraes, S. M., Marques, M. M. M., Lima, D. M., Santos, S. C. C., Almeida, R. R., ... & Guedes, M. I. F. (2011). Antiviral activities of extracts and phenolic components of two *Spondias* species against dengue virus. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 17, 406-413. <<https://doi.org/10.1590/S1678-91992011000400007>>

- Siqueira, J. C. (2017). Avaliação da estabilidade de uma emulsão cosmética cold cream contendo diferentes tipos de ceras. Trabalho de Conclusão de Curso.
- Sobrinho, A. C. N., de Moraes, S. M., Marinho, M. M., de Souza, N. V., & Lima, D. M. (2021). Antiviral activity on the Zika virus and larvicidal activity on the *Aedes* spp. of *Lippia alba* essential oil and β -caryophyllene. *Industrial Crops and Products*, 162, 113281. <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113281>>
- Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., & Škrlec, I. (2021). *Candida albicans*—the virulence factors and clinical manifestations of infection. *Journal of Fungi*, 7(2), 79. <<https://doi.org/10.3390/jof7020079>>
- Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 12(1), 40-53. <<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>>
- Wu, Y., Luo, Y., Wang, Q. (2012) Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid–liquid dispersion method. *LWT-Food Science and Technology*, v. 48, n. 2, p. 283-290. <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.027>>
- Xu, Z., Huang, T., Du, M., Soteyome, T., Lan, H., Hong, W., ... & Kjellerup, B. V. (2022). Regulatory network controls microbial biofilm development, with *Candida albicans* as a representative: From adhesion to dispersal. *Bioengineered*, 13(1), 253-267. <<https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1996747>>
- Yazgan, H. (2020). Investigation of antimicrobial properties of sage essential oil and its nanoemulsion as antimicrobial agent. *Lwt*, 130, 109669. <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109669>>
- Zang, X., Wang, J., Yu, G., & Cheng, J. (2019). Adição de polissacarídeos aniônicos para melhorar a estabilidade de emulsões estabilizadas com hidrolisado de proteína de farelo de arroz. *LWT*, 111, 573-581. <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.020>>

5 CONCLUSÃO

Nanoemulsões de alginato contendo óleo essencial de *Lippia origanoides* foram produzidas e testadas contra *Candida albicans*. As nanoemulsões com teor de óleo essencial de *L. origanoides* abaixo de 5 mg/mL não apresentaram atividade antifúngica. A presença do óleo de girassol favoreceu a formação de creaming, mas também foi essencial para estabilizar as partículas do óleo essencial, tornando-as menores e com morfologia mais adequada. Os resultados dos testes antifúngicos contra *C. albicans* na forma planctônica e de biofilme mostraram que as nanoemulsões apresentaram CIM igual ou maior que o óleo essencial livre. A nanoemulsão NE_5R se destacou, com CFM menor que o óleo essencial livre para a maioria das cepas testadas. Além disso, a nanoemulsão NE_5R foi mais eficaz na erradicação do biofilme de *C. albicans*, eliminando até 89,7% de sua massa. Em conclusão, as nanoemulsões de alginato contendo óleo essencial de *L. origanoides* são uma abordagem promissora para o tratamento de infecções fúngicas ocasionadas por *C. albicans*. As nanoemulsões apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans*, incluindo a forma de biofilme, e a nanoemulsão NE_R5 se destacou por sua eficácia.

REFERÊNCIAS

- AHMED, Hiwa M.; NABAVI, Seyed; BEHZAD, Sahar. Herbal drugs and natural products in the light of nanotechnology and nanomedicine for developing drug formulations. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 302-313, 2021.
- ALAO, Ifeoluwa Israel et al. Síntese Verde de Nanopartículas de Cobre e Investigação de Suas Propriedades Antimicrobianas. **Advanced Journal of Chemistry-Section B**, v. 4, n. 1, pág. 39-52, 2022.
- ALIM, Darakshan; SIRCAIK, Shabnam; PANWAR, Sneha Lata. The significance of lipids to biofilm formation in *Candida albicans*: an emerging perspective. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 140, 2018.
- ANSARI, S. H.; ISLAM, Farha; SAMEEM, Mohd. Influence of nanotechnology on herbal drugs: A Review. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 3, n. 3, p. 142, 2012.
- ANTON, Nicolas; BENOIT, Jean-Pierre; SAULNIER, Patrick. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review. **Journal of controlled release**, v. 128, n. 3, p. 185-199, 2008.

- APARECIDA BRAGA, Mariana et al. Prospecção de moduladores enzimáticos em extratos aquosos e etanólicos de folhas de *Lippia sidoides*: genotoxicidade, digestão, inflamação e hemostasia. **Química & Biodiversidade**, v. 16, n. 3, pág. e1800558, 2019.
- APOLINÁRIO, Aleksandra Conceição et al. Abrindo a caixa de pandora dos nanomedicamentos: Há realmente muito ‘espaço lá embaixo’. **Química Nova**, v. 43, p. 212-225, 2020.
- ARGENTA, Scheila Crestanello et al. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências**, v. 7, n. 12, p. 51-60, 2011.
- ARITA, Glaucia Sayuri et al. Serial systemic *Candida albicans* infection highlighted by proteomics. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, p. 230, 2019.
- ARORA, Daljit Singh; ONSARE, Jemimah Gesare; KAUR, Harpreet. Bioprospecting of *Moringa* (Moringaceae): microbiological perspective. **Journal of pharmacognosy and phytochemistry**, v. 1, n. 6, 2013.
- ARRUDA, Theodora Thays Prado. Perfil de sensibilidade de cepas planctônicas e biofilmes de *Enterococcus faecalis* frente a desafios antimicrobianos. 2007.
- ASSIS, Ellen Lima et al. A Systematic Review of the Potential Effects of *Lippia sidoides* on Dental Plaque and Periodontal Diseases. **Planta Medica**, 2021.
- ASSIS, Letícia Marques de et al. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.
- BARBEDO, L. S.; SAGARBI D. B. G. Candidíasis. DST - **J bras Doenças Sex Transm**, Niterói, v. 22, n. 1, p. 22-38, apr. 2010.
- BARBOSA, R. et al. Effects of *Lippia sidoides* essential oil, thymol, p-cymene, myrcene and caryophyllene on rat sciatic nerve excitability. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, 2017.
- BARREIRO, Eliezer J.; BOLZANI, Vanderlan da Silva. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 679-688, 2009.
- BORRELLI, Francesca; CAPASSO, Raffaele; IZZO, Angelo A. Garlic (*Allium sativum* L.): adverse effects and drug interactions in humans. **Molecular nutrition & food research**, v. 51, n. 11, p. 1386-1397, 2007.
- BOTELHO, B. O. et al. Aplicação de nanoemulsões na agricultura e medicina veterinária. **Tópicos especiais em ciência animal VII**, 143, 2018.
- BOTELHO, M. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 3, p. 349-356, 2007.
- BOURNE, Krystyn Z. et al. Plant products as topical microbicide candidates: assessment of in vitro and in vivo activity against herpes simplex virus type 2. **Antiviral research**, v. 42, n. 3, p. 219-226, 1999.

BRAUNSDORF, Christina; LEIBUNDGUT-LANDMANN, Salomé. Modulation of the fungal-host interaction by the intra-species diversity of *C. albicans*. **Pathogens**, v. 7, n. 1, p. 11, 2018.

BRITO, D. I. V. et al. Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 836-844, 2015.

CALDERONE, Richard A.; FONZI, William A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 7, p. 327-335, 2001.

CARVALHO, Camila O. et al. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. **Veterinary parasitology**, v. 183, n. 3-4, p. 260-268, 2012.

CASANOVA, Livia M.; COSTA, Sônia S. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista virtual de química**, v. 9, n. 2, p. 575-595, 2017.

CASTRO, C. E. et al. Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham.(Verbenaceae) essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 293-297, 2011.

CAVALCANTI, S. C. H. et al. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 829-832, 2010.

CHANG, Jia-Ming et al. Potential use of *Plectranthus amboinicus* in the treatment of rheumatoid arthritis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 1, p. 115-120, 2010.

CHEN, Hui et al. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 337-348, 2020.

CLEVELAND, Angela Ahlquist et al. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008–2013: results from population-based surveillance. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0120452, 2015.

CODEVILLA, Cristiane Franco et al. Nanoestruturas contendo compostos bioativos extraídos de plantas. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 5, p. 142-151, 2015.

COLA, Diego Faria et al. Sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados para ivermectina e metopreno visando controle de parasitas. **Química Nova**, v. 39, p. 1034-1043, 2016.

COLES, Makenly E. et al. Assessment of *Lippia organoides* essential oils in a *Salmonella typhimurium*, *Eimeria maxima*, and *Clostridium perfringens* challenge model to induce necrotic enteritis in broiler chickens. **Animals**, v. 11, n. 4, p. 1111, 2021.

COSTA, E. F.; ANDRÉ, W. P. P.; AbREU, F. O. M. S. Estudo da estabilidade de emulsões de quitosana com óleo de *Eucalypto citriodora*. **As ciências exatas e da terra e a interface com vários saberes**. 1ed. Paraná: Atena, v. 1 p. 87-92, 2019.

DADAR, Maryam et al. *Candida albicans*-Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control—An update. **Microbial pathogenesis**, v. 117, p. 128-138, 2018.

DAMODHARAN, Jaishree. Nanomaterials in medicine—An overview. **Materials Today: Proceedings**, v. 37, p. 383-385, 2021.

DUAN, Fei; KWEK, Dingtian; CRIVOI, Alexandru. Viscosity affected by nanoparticle aggregation in Al₂O₃-water nanofluids. **Nanoscale research letters**, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2011.

DURIGAN, G et al. **Plantas Pequenas do Cerrado: Biodiversidade Negligenciada**. 1^o Edição. São Paulo: CETESB, 2018. Disponível em: <<https://arquivo.ambiente.sp.gov.br/publicacoes/2018/12/plantaspequenasdocerrado.pdf>>. Acesso em: 01/05/2022

FARIAS, Edineide Maria Figueirôa Gomes et al. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham.(Verbenaceae) against clinical isolates of *Candida* species. **Journal of Herbal Medicine**, v. 2, n. 3, p. 63-67, 2012.

FAROKHZAD, Omid C.; LANGER, Robert. Impact of nanotechnology on drug delivery. **ACS nano**, v. 3, n. 1, p. 16-20, 2009.

FELICIANO, Rayan Pereira; MUCHON, Alexandre Mendes; DE ALMEIDA, Alex Magalhães. Uso de extrato de plantas na identificação de elementos metálicos em meio aquoso: uma abordagem analítica. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 8, n. 3, p. 2061-2068, 2022.

FELIX E SILVA, Altieri et al. Antibacterial and antibiofilm activities and synergism with florfenicol from the essential oils of *Lippia sidoides* and *Cymbopogon citratus* against *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 3, p. 1802-1812, 2022.

FERNANDES, M. L. **Investigação da toxicidade pré-clínica e possíveis mecanismos de ação central do timol em camundongos: estudos neuroquímicos e participação do estresse oxidativo**. 2017. 146 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. Disponível em: <<https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/38118>> Acesso em: 04/05/2022

FIRMO, Wellyson da Cunha Araújo et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de pesquisa**, 2011.

FONTENELLE, R. O. S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 934-940, 2007.

FRANCIMAT, Lílian Pinheiro et al. Eficiência na desinfecção de alginato contaminado com *Candida albicans* utilizando-se ácido peracético e alecrim-pimenta Antimicrobial effect of *Lippia sidoides* and peracetic acid on *C. albicans* biofilm formed on alginate impression. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 5, p. 18601-18611, 2021.

FRANK, Kporwodu et al. Alginate biocomposite films incorporated with cinnamon essential oil nanoemulsions: Physical, mechanical, and antibacterial properties. **International Journal of Polymer Science**, v. 2018, p. 1-8, 2018.

- FRANZOL, Angelica; REZENDE, Mirabel Cerqueira. Emulsion stability: a case study involving anionic, cationic and nonionic emulsifiers. **Polímeros**, v. 25, p. 1-9, 2015.
- FREIRES, Irlan Almeida et al. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 7329-7358, 2015.
- FUNARI, Cristiano Soleo et al. Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 2086-2094, 2012.
- GAO, Xiangpeng et al. Adsorption of heavy metal ions by sodium alginate based adsorbent-a review and new perspectives. **International journal of biological macromolecules**, v. 164, p. 4423-4434, 2020.
- GIULIETTI¹, ANA MARIA et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. 2005.
- GUIMARÃES, Luiz Gustavo de L. et al. Características gerais, fitoquímica e farmacognosia de *Lippia sidoides*. **Comunicações de produtos naturais**, v. 10, n. 11, pág. 1934578X1501001116, 2015.
- HACIOGLU, Mayram et al. In vitro activities of antifungals alone and in combination with tigecycline against *Candida albicans* biofilms. **PeerJ**, v. 6, p. e5263, 2018.
- HEIDARI, M. R.; ASADIPOUR, A.; GHAYOUR, M. **Evaluation of analgesic and ulcerogenic effect of methanolic extract of matricaria chamomilla L.** 2002.
- HEINRICH, Michael et al. **Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy E-BOOK.** Elsevier Health Sciences, 2017.
- HEINZMANN, Berta Maria; DE BARROS, Francisco Maikon Correa. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **Saúde (Santa Maria)**, v. 33, n. 1, p. 43-48, 2007.
- JACOB, Michelle Cristine Medeiros; ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino (Ed.). **Local food plants of Brazil.** Springer Nature, 2021.
- KARTHIK, P.; EZHILARASI, P. N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, Chinnaswamy. Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 7, p. 1435-1450, 2017.
- KHANBEIGI, Raha Ahmad et al. The delivered dose: Applying pharmacokinetics to in vitro investigations of nanoparticle internalization by macrophages. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 2, p. 259-266, 2012.
- KIM, Kang-Ju et al. Natural products for infectious diseases. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.
- KIRCHNER, Giovanna Albuquerque et al. Possíveis interações medicamentosas de fitoterápicos e plantas medicinais incluídas na relação nacional de medicamentos essenciais do SUS: revisão sistemática. **Revista Fitos**, v. 16, n. 1, p. 93-119, 2022.
- LAMOTH, Frederic et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. suppl_1, p. i4-i13, 2018.

- LEE, Kuen Yong; MOONEY, David J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in polymer science**, v. 37, n. 1, p. 106-126, 2012.
- LIMA, Glauber Pacelli Gomes et al. Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton species* against *Aedes aegypti* L. **Parasitology Research**, v. 112, p. 1953-1958, 2013.
- LOBO, Patrícia Leal Dantas et al. Dose–response evaluation of a novel essential oil against *Mutans streptococci* in vivo. **Phytomedicine**, v. 18, n. 7, p. 551-556, 2011.
- LOBO, Patrícia Leal Dantas et al. The efficacy of three formulations of *Lippia sidoides* Cham. essential oil in the reduction of salivary *Streptococcus mutans* in children with caries: A randomized, double-blind, controlled study. **Phytomedicine**, v. 21, n. 8-9, p. 1043-1047, 2014.
- LOTTENBERG, Ana MP et al. Eficiência dos ésteres de fitoesteróis alimentares na redução dos lípides plasmáticos em hipercolesterolêmicos moderados. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 79, n. 2, p. 139-142, 2002.
- MALIK, Marya Nawaz et al. Bioprospecting *Dodonaea viscosa* Jacq.; a traditional medicinal plant for antioxidant, cytotoxic, antidiabetic and antimicrobial potential. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 103688, 2022.
- MARÇAL, R. M. et al. Antinociceptive effect of the essential oil of *Lippia sidoides* on mice. **Planta Medica**, v. 72, n. 11, p. P_291, 2006.
- MARTINI, E., **Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: Formulação e caracterização físico-química**. 2005. 106f. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle de Produtos Farmacêuticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- MAYER, François L.; WILSON, Duncan; HUBE, Bernhard. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.
- MCCLEMENTS, David Julian. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft matter**, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012.
- MEDEIROS, Maria das Gracas Freire et al. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, v. 60, n. 3, p. 237-241, 2011.
- MENESES, Rocío et al. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication *in vitro*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2009.
- MENEZES, Eduardo Henrique Azevedo et al. As plantas do bioma caatinga com potencial neuroprotetor: uma revisão integrativa. **Biodiversidade**, v. 20, n. 4, 2021.
- MINA, Robert Tulio González; MONTAÑO, Ana Milena Hurtado. Primeros ensayos para el cultivo y caracterización del aceite esencial de *Conobea scoparioides* (Cham. & Schltdl.) Benth. para el Pacífico colombiano. **Entramado**, p. 24-35, 2010.
- MITCHELL, Kaitlin F.; ZARNOWSKI, Robert; ANDES, David R. The extracellular matrix of fungal biofilms. **Fungal biofilms and related infections**, p. 21-35, 2016.

MONTEIRO, Maria Vivina Barros et al. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 378-382, 2007.

MOTA, Aquiles Paulino Peres; DANTAS, João Carlos Pinheiro; FROTA, Cristiane Cunha. Antimicrobial activity of essential oils from *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Cymbopogon citrates*, *Plectranthus amboinicus*, and *Cinnamomum zeylanicum* against *Mycobacterium tuberculosis*. **Ciência Rural**, v. 48, 2018.

NASCIMENTO, Joice Farias; COSTA, Emanuela Feitoza; ABREU, Flávia Oliveira Monteiro Silva. Caracterizações de nanoemulsões de alginato de sódio com óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*. **Revista Coleta Científica**, v. 4, n. 8, p. 15-22, 2020.

NAVES, Plínio Lázaro Faleiro et al. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 2, p. 229-233, 2013.

NIJVELDT, Robert J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American journal of clinical nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.

NONATO, Carla de Fatima Alves et al. Comparative analysis of chemical profiles and antioxidant activities of essential oils obtained from species of *Lippia* L. by chemometrics. **Food Chemistry**, v. 384, p. 132614, 2022.

OLIVEIRA, Adriana SS et al. Chemical study and evaluation of the antimicrobial activity of extract and essential oil of *Lippia sidoides* Cham., Verbenaceae. 2018.

OLIVEIRA, F. A. M. **Infecções oportunistas causadas por leveduras do gênero candida sp. em pacientes imunocomprometido**. 2012. Monografia (Especialização em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

OLIVER, Josidel Conceição et al. *Candida* spp. and phagocytosis: multiple evasion mechanisms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 112, n. 10, p. 1409-1423, 2019.

PAPPAS, G. P. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews**, Birmingham, v. 4, p. 1-20, mai. 2018.

PARENTE, Michele Sanford Rangel et al. Antidepressant-like effect of *Lippia sidoides* CHAM (verbenaceae) essential oil and its major compound thymol in mice. **Scientia Pharmaceutica**, v. 86, n. 3, p. 27, 2018.

PASCUAL, María Elena et al. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **Il Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 501-504, 2001.

PEREIRA, Renata Junqueira; DAS GRAÇAS CARDOSO, Maria. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.

PEY, C. M. et al. Optimization of nano-emulsions prepared by low-energy emulsification methods at constant temperature using a factorial design study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 288, n. 1-3, p. 144-150, 2006.

PIERCE, Christopher G. et al. The *Candida albicans* biofilm matrix: composition, structure and function. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 14, 2017.

Pinheiro, L.G. **Potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Lippia sidoides* contra bactérias gram-negativas multidroga resistentes**. 2021. 61f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Campus de Sobral, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2021. Disponível em: <<https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/62348>> Acesso em: 01/05/2022.

PIRES, I. C. et al. Antibacterial and antibiofilm activities and synergism with florfenicol from the essential oils of *Lippia sidoides* and *Cymbopogon citratus* against *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Applied Microbiology**, 2021.

POULAIN, D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. **Critical reviews in Microbiology**, Lille, p. 1-10, aug. 2013.

PRAKASH, Bhanu et al. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food control**, v. 89, p. 1-11, 2018.

RABINOVICH-GUILATT, Laura et al. Extensive surface studies help to analyse zeta potential data: the case of cationic emulsions. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 131, n. 1, p. 1-13, 2004.

RAFIEIAN-KOPAEI, Mahmoud. Medicinal plants and the human needs. **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 1, 2012.

RAJ, Shweta et al. Review on natural products as an alternative to contemporary anti-leishmanial therapeutics. **Journal of Proteins and Proteomics**, v. 11, n. 2, p. 135-158, 2020.

RANASINGHE, Priyanga et al. Medicinal properties of ‘true’cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2013.

REDDY, S. R.; MELIK, D. H.; FOGLER, H. Scott. Emulsion stability—theoretical studies on simultaneous flocculation and creaming. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 82, n. 1, p. 116-127, 1981.

Reflora: Plantas do Brasil: Resgate histórico e herbário virtual para o conhecimento e conservação da flora brasileira. *Lippia* L. 2020. Disponível em: <[REIS, Fernanda B. et al. Use of *Carnobacterium maltaromaticum* cultures and hydroalcoholic extract of *Lippia sidoides* Cham. against *Listeria monocytogenes* in fish](http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=18&idsFilhosAlgas=%5B2%5D&idsFilhosFungos=%5B1%2C11%2C10%5D&lingua=&grupo=6&familia=null&genero=LIPPIA&especie=&autor=&nomeVernaculo=&nomeCompleto=&formaVida=null&substrato=null&ocorreBrasil=QUALQUER&ocorrencia=OCORRE&endemismo=TODOS&origem=TODOS®iao=QUALQUER&estado=QUALQUER&ilhaOceanica=32767&domFitogeograficos=QUALQUER&bacia=QUALQUER&vegetacao=TODOS&mostrarAte=SUBESP_VAR&opcoesBusca=TODOS_OS_NOMES&loginUsuario=Visitante&senhaUsuario=&contexto=consulta-publica> Acesso em: 01/05/2022.</p>
</div>
<div data-bbox=)

model systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 3, p. 228-234, 2011.

ROCHA, Rodhes Geovana Almeida et al. Ação da *Lippia sidoides* Cham nas infecções de faringe, cavidade oral e problemas odontológicos: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, p. e34911326537-e34911326537, 2022.

ROCHA, Wilma Raianny Vieira et al. Gênero *Candida*-Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e43910414283-e43910414283, 2021.

RODRIGUES, Márcio Tavares et al. Association between vaginal secretion culture, socio-demographic characteristics and clinical manifestations of patients with vulvovaginal candidiasis. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 35, p. 554-561, 2013.

ROSCETTO, Emanuela et al. Antifungal and anti-biofilm activity of the first cryptic antimicrobial peptide from an archaeal protein against *Candida* spp. clinical isolates. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

ROSSI, Tatiane et al. Interações entre *Candida albicans* e Hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 15-28, 2011.

SACHAN, Nikhil K. et al. Sodium alginate: the wonder polymer for controlled drug delivery. **J. Pharm. Res**, v. 2, n. 8, p. 1191-1199, 2009.

SÁ-FILHO, Geovan Figueirêdo et al. Plantas medicinais utilizadas na caatinga brasileira e o potencial terapêutico dos metabólitos secundários: uma revisão. **Research, society and development**, v. 10, n. 13, p. e140101321096-e140101321096, 2021.

SAHU, Pankaj K. et al. Therapeutic and medicinal uses of *Aloe vera*: a review. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 4, n. 08, p. 599, 2013.

SALCI, Tânia P. et al. Targeting *Candida* spp. to develop antifungal agents. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 4, p. 802-814, 2018.

SARAIVA, Sarah Raquel Gomes Lima et al. A implantação do programa de plantas medicinais e fitoterápicos no sistema público de saúde no Brasil: uma revisão de literatura. **Revista Interdisciplinar de Pesquisa e Inovação**, v. 1, n. 1, 2015.

SENDID, Boualem et al. Combined detection of mannanaemia and anti-mannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. **Journal of medical microbiology**, v. 51, n. 5, p. 433-442, 2002.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: A pharmaceutical review. **Systematic reviews in pharmacy**, v. 1, n. 1, 2010.

SILVA, D. B. S. **Filogenia e bioprospecção de mutações no gene *erg11* de isolados clínicos do gênero *Candida***. 2015.. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral). Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados, 2015.

SIMÕES, Claudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 12, p. 35-40, 2002.

SINGH, Rajni; SMITHA, M. S.; SINGH, Surinder P. The role of nanotechnology in combating multi-drug resistant bacteria. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 14, n. 7, p. 4745-4756, 2014.

SINGH, Yuvraj et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of controlled release**, v. 252, p. 28-49, 2017.

SIQUEIRA, Jaqueline Cardoso de. **Avaliação da estabilidade de uma emulsão cosmética cold cream contendo diferentes tipos de ceras**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso.

SIQUEIRA, Virginia Medeiros et al. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis**, v. 53, n. 2, p. 89-95, 2011.

SOLANS, Conxita et al. Nano-emulsions. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 10, n. 3-4, p. 102-110, 2005.

SOUZA, Barbhara Nayara Oliveira et al. Diversidade e uso das plantas cultivada na comunidade Cinturão Colina Verde, CUIABÁ-MT, BRASIL. **Biodiversidade**, v. 14, n. 3, 2015.

SUNTRES, Zacharias E.; COCCIMIGLIO, John; ALIPOUR, Misagh. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 3, p. 304-318, 2015.

SURASSMO, Suvimol et al. Effects of surfactants on the physical properties of capsicum oleoresin-loaded nanocapsules formulated through the emulsion–diffusion method. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 8-17, 2010.

TADROS, Th F. Correlation of viscoelastic properties of stable and flocculated suspensions with their interparticle interactions. **Advances in colloid and interface science**, v. 68, p. 97-200, 1996.

TADROS, Tharwat. Principles of emulsion stabilization with special reference to polymeric surfactants. **Journal of cosmetic science**, v. 57, n. 2, p. 153-169, 2006.

TAFF, Heather T.; NETT, Jeniel E.; ANDES, David R. Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation assays. **Sabouraudia**, v. 50, n. 2, p. 214-218, 2012.

TALAPKO, Jasminka et al. *Candida albicans*—the virulence factors and clinical manifestations of infection. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 79, 2021.

TURRINI, Ruth Natalia Teresa. Infecção hospitalar e mortalidade. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 36, p. 177-183, 2002.

UPPULURI, Priya et al. *Candida albicans* dispersed cells are developmentally distinct from biofilm and planktonic cells. **MBio**, v. 9, n. 4, p. e01338-18, 2018.

VERAS, Helenicy NH et al. Enhancement of aminoglycosides and β -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the thymol. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2790-S2795, 2017.

VICIDOMINI, Caterina; ROVIELLO, Valentina; ROVIELLO, Giovanni N. Molecular basis of the therapeutical potential of clove (*Syzygium aromaticum* L.) and clues to its anti-COVID-19 utility. **Molecules**, v. 26, n. 7, p. 1880, 2021.

VIZZOTTO, Márcia; KROLOW, A. C. R.; WEBER, Gisele Eva Bruch. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

WANI, Abdul Rouf et al. An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses. **Microbial Pathogenesis**, v. 152, p. 104620, 2021.

WEISS, Jochen et al. Nanostructured encapsulation systems: food antimicrobials. In: **Global issues in food science and technology**. Academic Press, 2009. p. 425-479.

WITCHLEY, Jessica N. et al. *Candida albicans* morphogenesis programs control the balance between gut commensalism and invasive infection. **Cell host & microbe**, v. 25, n. 3, p. 432-443. e6, 2019.

WOUDA-VAN DER TUIN. *Candida*. **Natuurpraktijk aurora**. 2016. Disponível em: <https://natuurpraktijkaurora.com/2016/12/01/candida-2/>. Acesso em 17 de maio de 2022.

YANG, Zhikun et al. Development and characterization of sodium alginate/tea tree essential oil nanoemulsion active film containing TiO₂ nanoparticles for banana packaging. **International journal of biological macromolecules**, v. 213, p. 145-154, 2022.

ZAMITH-MIRANDA, Daniel et al. Comparative molecular and immunoregulatory analysis of extracellular vesicles from *Candida albicans* and *Candida auris*. **Msystems**, v. 6, n. 4, p. e00822-21, 2021.

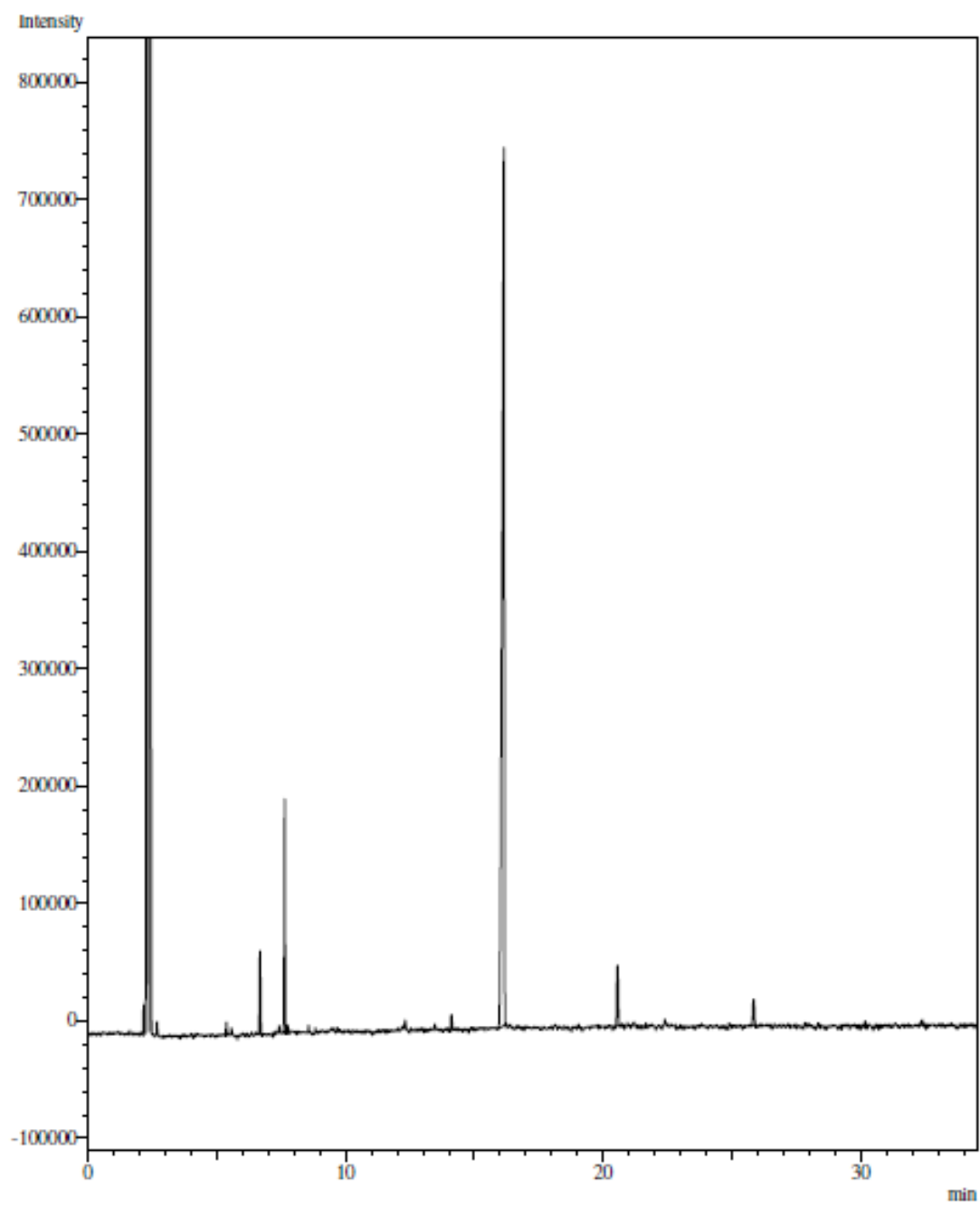
ZANOTTO, Aline Wasem et al. Enhanced antimicrobial and antioxidant capacity of *Thymus vulgaris*, *Lippia sidoides*, and *Cymbopogon citratus* emulsions when combined with mannosylerythritol a lipid biosurfactant. **Food Research International**, v. 163, p. 112213, 2023.

ZARNOWSKI, Robert et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. **MBio**, v. 5, n. 4, p. e01333-14, 2014.

ZHANG, Yuxuan et al. Improved pharmaceutical research and development with AIE-based nanostructures. **Materials Horizons**, v. 5, n. 5, p. 799-812, 2018.

ZHANG, Zipei; MCCLEMENTS, David J. Overview of nanoemulsion properties: Stability, rheology, and appearance. In: **Nanoemulsions**. Academic Press, p. 21-49, 2018.

ZORZI, Giovanni Konat et al. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 426-436, 2015.

ANEXO A – CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *L. origanoides*

ANEXO B – LEITURA DO TAMANHO DE PARTÍCULAS DAS NANOEMULSÕES

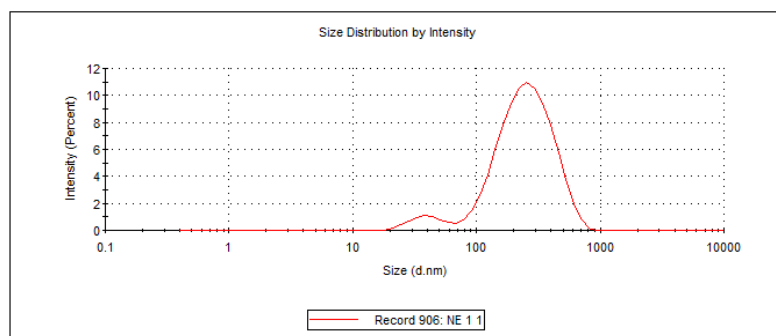
NE_10GE

Sample Name: NE 1 1
 SOP Name: mansettings.nano
 File Name: Rachel_LTE.dts
 Record Number: 906
 Material RI: 1,45
 Material Absorbtion: 0,001
 Dispersant Name: Water
 Dispersant RI: 1,330
 Viscosity (cP): 0,8872
 Measurement Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 202...

Temperature (°C): 25,0
 Count Rate (kcps): 211,6
 Cell Description: Disposable sizing cuvette
 Duration Used (s): 70
 Measurement Position (mm): 4,65
 Attenuator: 7

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 188,0	Peak 1: 275,4	93,8	129,7
Pdl: 0,288	Peak 2: 41,93	6,2	12,71
Intercept: 0,930	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : **Good**

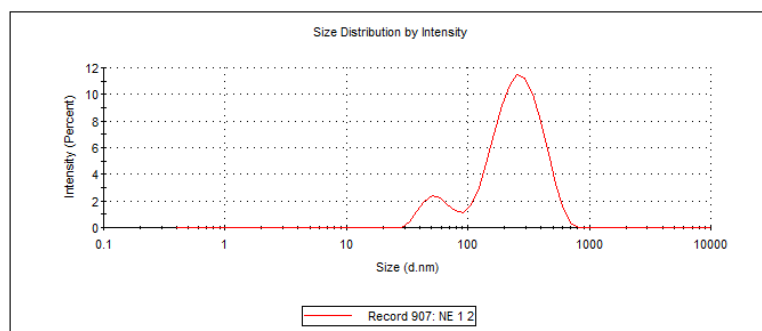


Sample Name: NE 1 2
 SOP Name: mansettings.nano
 File Name: Rachel_LTE.dts
 Record Number: 907
 Material RI: 1,45
 Material Absorbtion: 0,001
 Dispersant Name: Water
 Dispersant RI: 1,330
 Viscosity (cP): 0,8872
 Measurement Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 202...

Temperature (°C): 25,0
 Count Rate (kcps): 211,2
 Cell Description: Disposable sizing cuvette
 Duration Used (s): 70
 Measurement Position (mm): 4,65
 Attenuator: 7

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 177,3	Peak 1: 278,8	87,7	116,7
Pdl: 0,312	Peak 2: 58,22	12,3	16,31
Intercept: 0,932	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : **Good**



Sample Name: NE 1 3
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Rachel_LTE.dts
Record Number: 908
Material RI: 1,45
Material Absorbion: 0,001

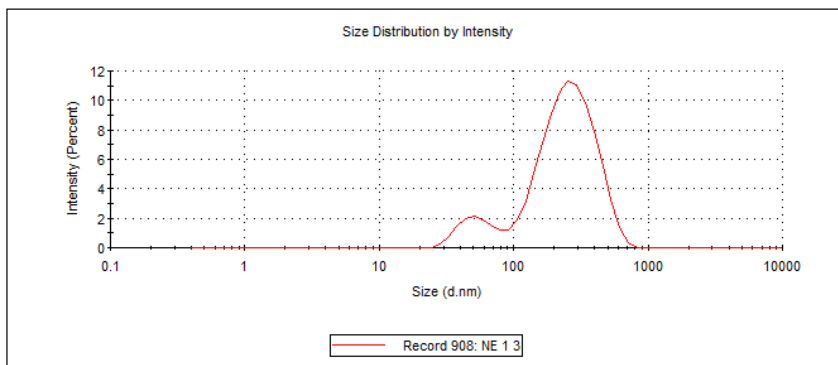
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 0,8872
Measurement Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 202...

Temperature (°C): 25,0
Count Rate (kcps): 208,9
Cell Description: Disposable sizing cuvette

Duration Used (s): 70
Measurement Position (mm): 4,65
Attenuator: 7

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 175,2	Peak 1: 275,1	89,0	119,5
PdI: 0,317	Peak 2: 52,83	11,0	13,93
Intercept: 0,937	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Good



NE_5GE

Sample Name: NE 2 3
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Rachel_LTE.dts
Record Number: 911
Material RI: 1,45
Material Absorbion: 0,001

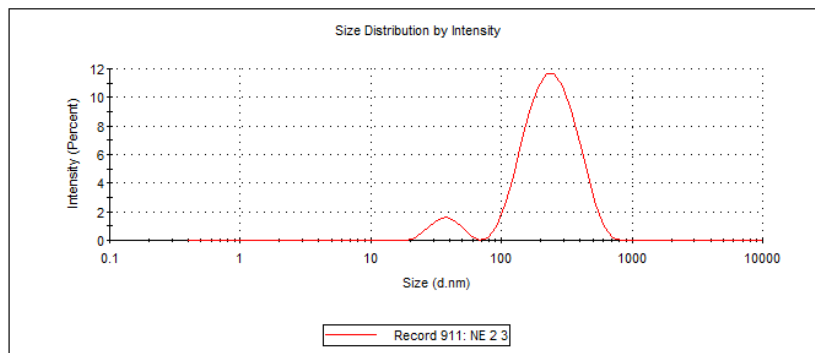
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 0,8872
Measurement Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 202...

Temperature (°C): 25,0
Count Rate (kcps): 447,0
Cell Description: Disposable sizing cuvette

Duration Used (s): 60
Measurement Position (mm): 4,65
Attenuator: 8

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 174,5	Peak 1: 259,5	92,8	111,2
PdI: 0,298	Peak 2: 37,57	7,2	8,967
Intercept: 0,906	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Refer to quality report

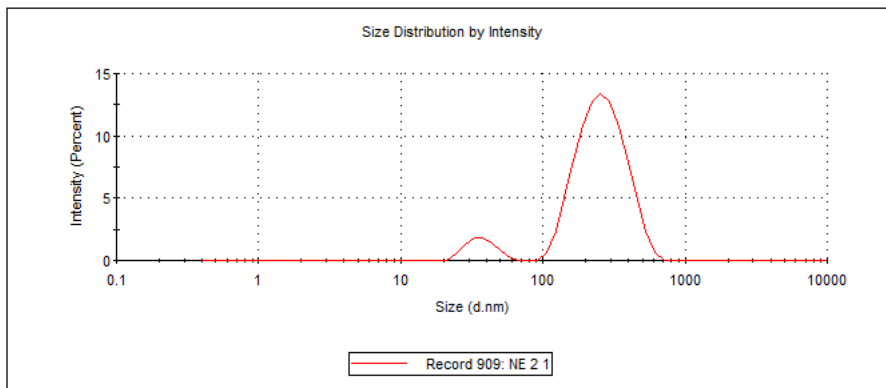


Sample Name: NE 2 1
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Rachel_LTE.dts
Record Number: 909
Material RI: 1,45
Material Absorbtion: 0,001
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 0,8872
Measurement Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 202...

Temperature (°C): 25,0
Count Rate (kcps): 454,4
Cell Description: Disposable sizing cuvette
Duration Used (s): 60
Measurement Position (mm): 4,65
Attenuator: 8

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 186,2	Peak 1: 272,1	92,2	101,0
Pdl: 0,307	Peak 2: 37,08	7,8	8,206
Intercept: 0,903	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Good

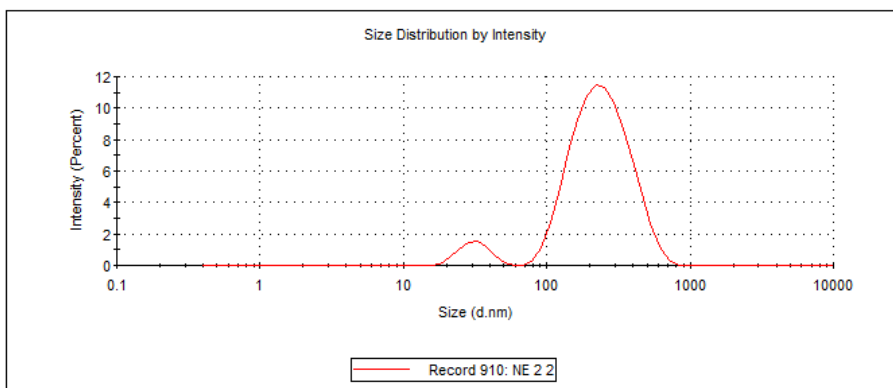


Sample Name: NE 2 2
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Rachel_LTE.dts
Record Number: 910
Material RI: 1,45
Material Absorbtion: 0,001
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 0,8872
Measurement Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 202...

Temperature (°C): 25,0
Count Rate (kcps): 427,7
Cell Description: Disposable sizing cuvette
Duration Used (s): 60
Measurement Position (mm): 4,65
Attenuator: 8

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 178,2	Peak 1: 258,9	93,5	115,7
Pdl: 0,298	Peak 2: 31,83	6,5	7,263
Intercept: 0,902	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Good



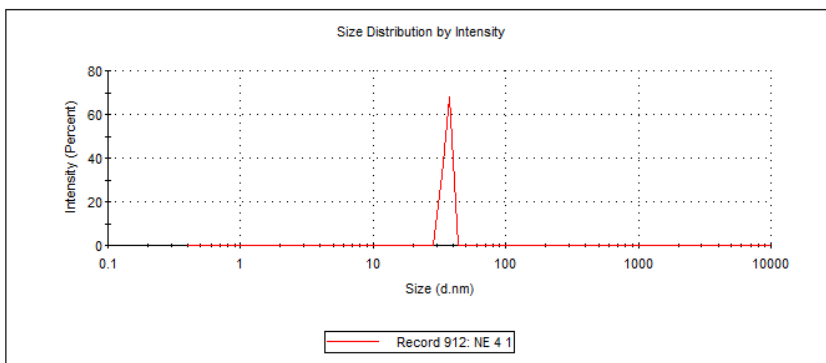
NE_5R

Sample Name: NE 4 1
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Rachel_LTE.dts
Record Number: 912
Material RI: 1,45
Material Absorbtion: 0,001
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 0,8872
Measurement Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 202...

Temperature (°C): 25,0
Count Rate (kcps): 569,7
Cell Description: Disposable sizing cuvette
Duration Used (s): 60
Measurement Position (mm): 4,65
Attenuator: 9

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 3115	Peak 1: 36,20	100,0	2,404
Pdl: 1,000	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,794	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Refer to quality report

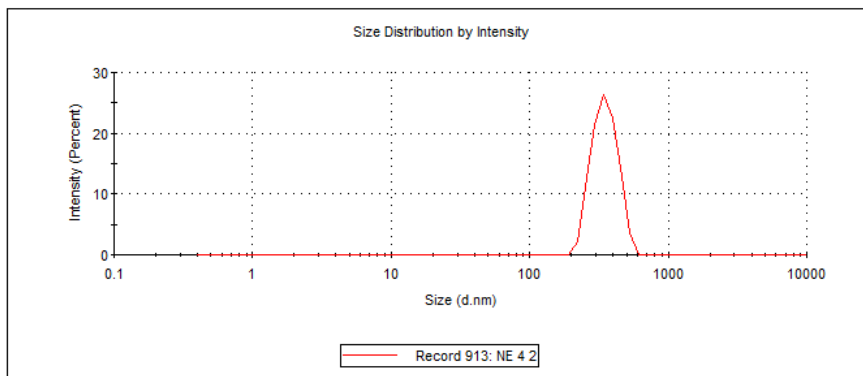


Sample Name: NE 4 2
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Rachel_LTE.dts
Record Number: 913
Material RI: 1,45
Material Absorbtion: 0,001
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 0,8872
Measurement Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 202...

Temperature (°C): 25,0
Count Rate (kcps): 496,8
Cell Description: Disposable sizing cuvette
Duration Used (s): 60
Measurement Position (mm): 4,65
Attenuator: 9

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 499,3	Peak 1: 354,1	100,0	72,04
Pdl: 0,296	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,491	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Refer to quality report



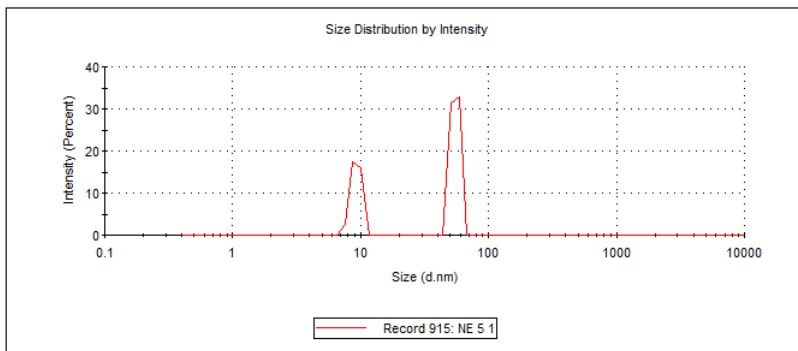
NE_2.5E

Sample Name: NE 5 1
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Rachel_LTE.dts
Record Number: 915
Material RI: 1,45
Material Absorbtion: 0,001
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 0,8872
Measurement Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 202...

Temperature (°C): 25,0
Count Rate (kcps): 361,6
Cell Description: Disposable sizing cuvette
Duration Used (s): 60
Measurement Position (mm): 4,65
Attenuator: 11

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 1771	Peak 1: 54,84	64,1	4,010
Pdl: 1,000	Peak 2: 9,256	35,9	0,8157
Intercept: 1,10	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Refer to quality report

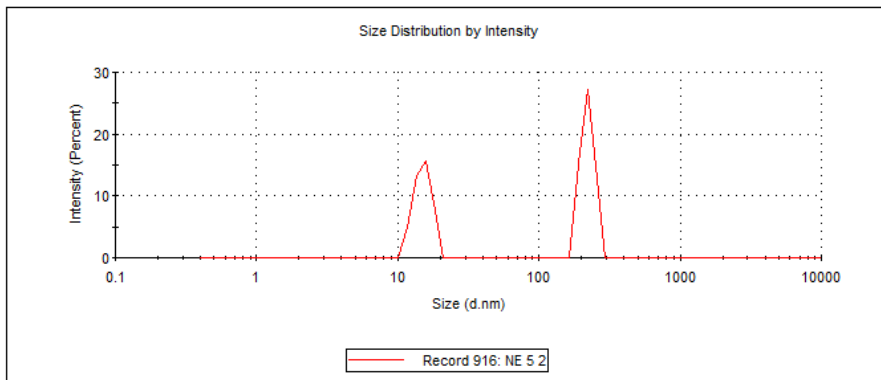


Sample Name: NE 5 2
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Rachel_LTE.dts
Record Number: 916
Material RI: 1,45
Material Absorbtion: 0,001
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 0,8872
Measurement Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 202...

Temperature (°C): 25,1
Count Rate (kcps): 323,7
Cell Description: Disposable sizing cuvette
Duration Used (s): 60
Measurement Position (mm): 4,65
Attenuator: 11

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 677,1	Peak 1: 221,2	57,2	23,53
Pdl: 0,682	Peak 2: 15,07	42,8	2,040
Intercept: 0,933	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Refer to quality report

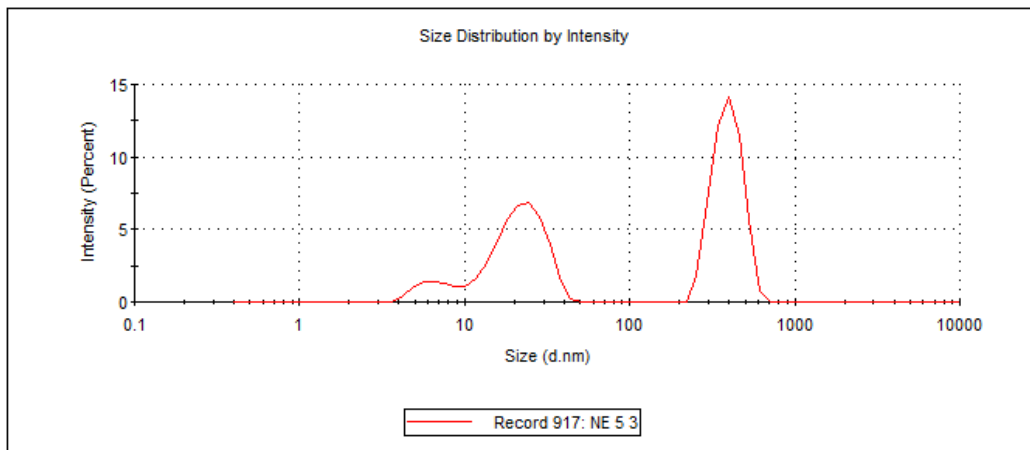


Sample Name: NE 5 3
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Rachel_LTE.dts
Record Number: 917
Material RI: 1,45
Material Absorbtion: 0,001
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 0,8872
Measurement Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 202...

Temperature (°C): 25,1
Count Rate (kcps): 322,3
Cell Description: Disposable sizing cuvette
Duration Used (s): 60
Measurement Position (mm): 4,65
Attenuator: 11

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 318,6	Peak 1: 397,1	52,3	78,68
Pdl: 0,550	Peak 2: 22,16	41,2	7,337
Intercept: 0,804	Peak 3: 6,451	6,5	1,388

Result quality : Refer to quality report



ANEXO C – LEITURA DO POTENCIAL ZETA DAS NANOEMULSÕES

NE_10GE

Sample Name: NE 1 1

SOP Name: mansettings.nano

File Name: Rachel_LTE.dts

Record Number: 927

Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 2022 08:...

Dispersant Name: Water

Dispersant RI: 1,330

Viscosity (cP): 0,8872

Dispersant Dielectric Constant: 78,5

Temperature (°C): 25,0

Count Rate (kcps): 307,1

Cell Description: Clear disposable zeta cell

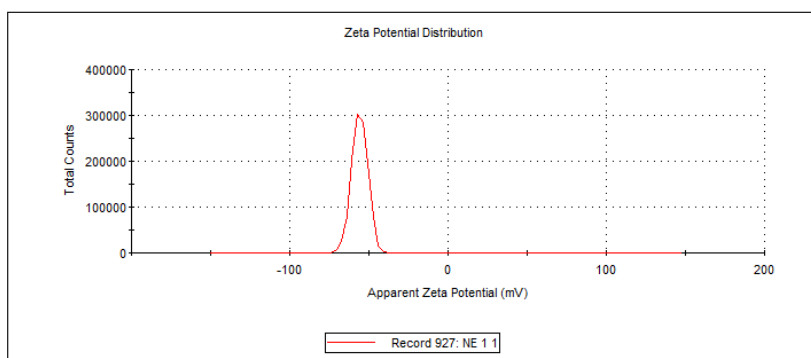
Zeta Runs: 12

Measurement Position (mm): 2,00

Attenuator: 9

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -55,8	Peak 1: -55,8	100,0	5,01
Zeta Deviation (mV): 5,01	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0378	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



Sample Name: NE 1 2

SOP Name: mansettings.nano

File Name: Rachel_LTE.dts

Record Number: 928

Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 2022 08:...

Dispersant Name: Water

Dispersant RI: 1,330

Viscosity (cP): 0,8872

Dispersant Dielectric Constant: 78,5

Temperature (°C): 25,0

Count Rate (kcps): 275,9

Cell Description: Clear disposable zeta cell

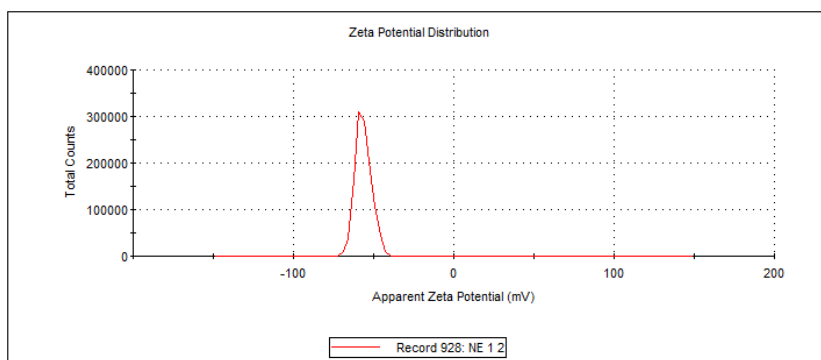
Zeta Runs: 12

Measurement Position (mm): 2,00

Attenuator: 9

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -56,4	Peak 1: -56,4	100,0	4,97
Zeta Deviation (mV): 4,97	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0456	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good

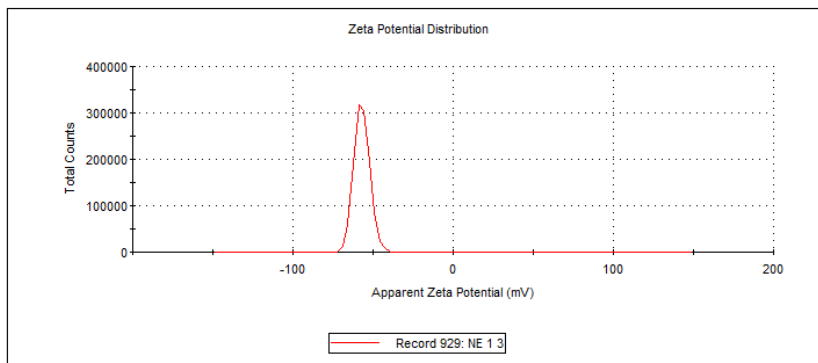


Sample Name: NE 13
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Rachel_LTE.dts
Record Number: 929
Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 2022 08:....
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 0,8872
Dispersant Dielectric Constant: 78,5

Temperature (°C): 24,9
Count Rate (kcps): 314,0
Cell Description: Clear disposable zeta cell
Zeta Runs: 12
Measurement Position (mm): 2,00
Attenuator: 9

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -57,0	Peak 1: -57,0	100,0	4,80
Zeta Deviation (mV): 4,80	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0365	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



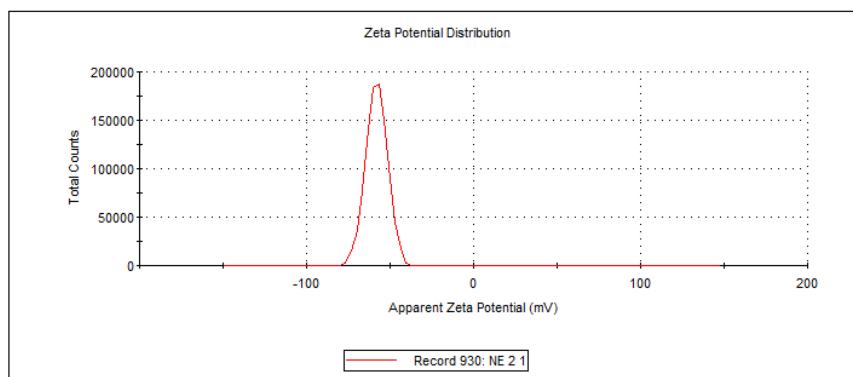
NE_5GE

Sample Name: NE 2 1
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Rachel_LTE.dts
Record Number: 930
Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 2022 08:....
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 0,8872
Dispersant Dielectric Constant: 78,5

Temperature (°C): 25,0
Count Rate (kcps): 115,7
Cell Description: Clear disposable zeta cell
Zeta Runs: 14
Measurement Position (mm): 2,00
Attenuator: 8

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -58,0	Peak 1: -58,0	100,0	6,38
Zeta Deviation (mV): 6,38	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0812	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good

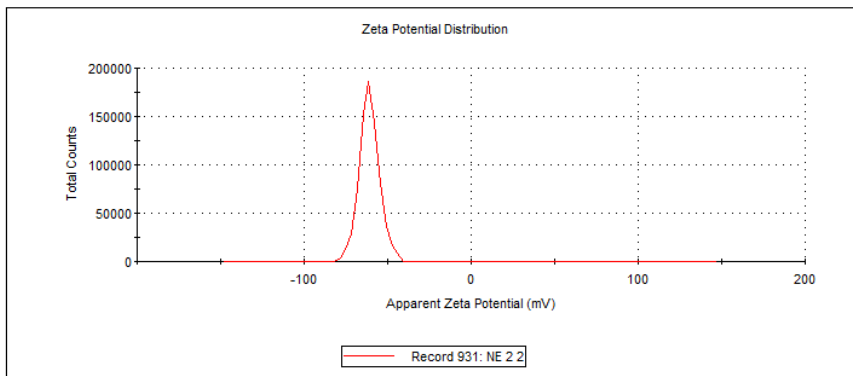


Sample Name: NE 2 2
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Rachel_LTE.dts
Record Number: 931
Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 2022 08:00:00
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 0,8872
Dispersant Dielectric Constant: 78,5

Temperature (°C): 25,0
Count Rate (kcps): 57,4
Cell Description: Clear disposable zeta cell
Zeta Runs: 12
Measurement Position (mm): 2,00
Attenuator: 8

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -61,0	Peak 1: -61,0	100,0	6,04
Zeta Deviation (mV): 6,04	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,108	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good

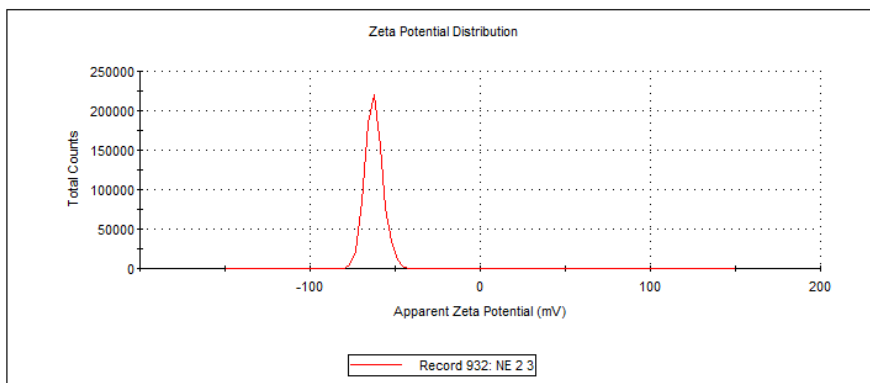


Sample Name: NE 2 3
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Rachel_LTE.dts
Record Number: 932
Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 2022 08:00:00
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 0,8872
Dispersant Dielectric Constant: 78,5

Temperature (°C): 25,0
Count Rate (kcps): 112,0
Cell Description: Clear disposable zeta cell
Zeta Runs: 12
Measurement Position (mm): 2,00
Attenuator: 8

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -62,4	Peak 1: -62,4	100,0	5,18
Zeta Deviation (mV): 5,18	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,109	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



NE_5R

Sample Name: NE 4 1
 SOP Name: mansettings.nano
 File Name: Rachel_LTE.dts
 Record Number: 933
 Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 2022 08:...

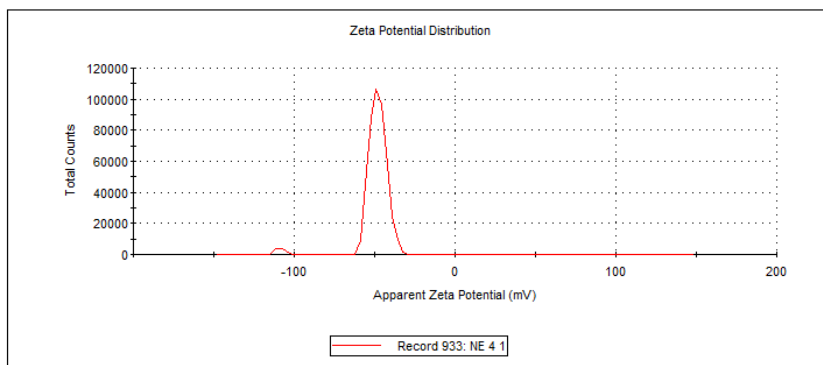
Dispersant Name: Water
 Dispersant RI: 1,330
 Viscosity (cP): 0,8872
 Dispersant Dielectric Constant: 78,5

Temperature (°C): 25,1
 Count Rate (kcps): 1127,6
 Cell Description: Clear disposable zeta cell

Zeta Runs: 12
 Measurement Position (mm): 2,00
 Attenuator: 11

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -49,3	Peak 1: -48,0	97,8	5,09
Zeta Deviation (mV): 10,3	Peak 2: -109	2,2	2,63
Conductivity (mS/cm): 0,0814	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : **Good**



Sample Name: NE 4 2
 SOP Name: mansettings.nano
 File Name: Rachel_LTE.dts
 Record Number: 934
 Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 2022 08:...

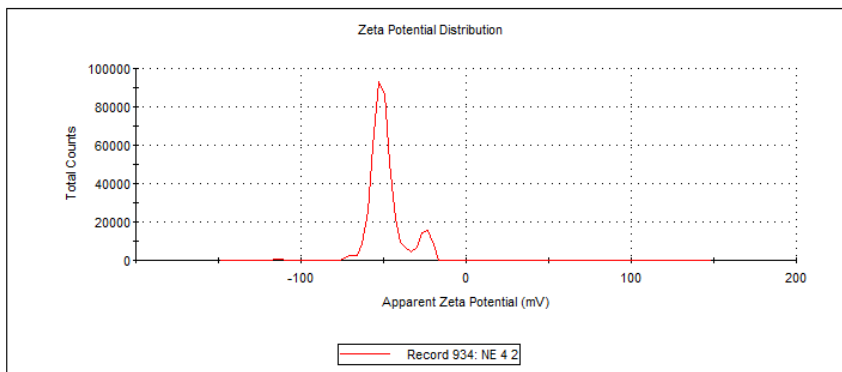
Dispersant Name: Water
 Dispersant RI: 1,330
 Viscosity (cP): 0,8872
 Dispersant Dielectric Constant: 78,5

Temperature (°C): 25,0
 Count Rate (kcps): 142,7
 Cell Description: Clear disposable zeta cell

Zeta Runs: 12
 Measurement Position (mm): 2,00
 Attenuator: 11

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -48,6	Peak 1: -51,3	88,0	6,06
Zeta Deviation (mV): 10,7	Peak 2: -25,4	11,8	3,82
Conductivity (mS/cm): 0,0811	Peak 3: -114	0,3	1,61

Result quality : **See result quality report**

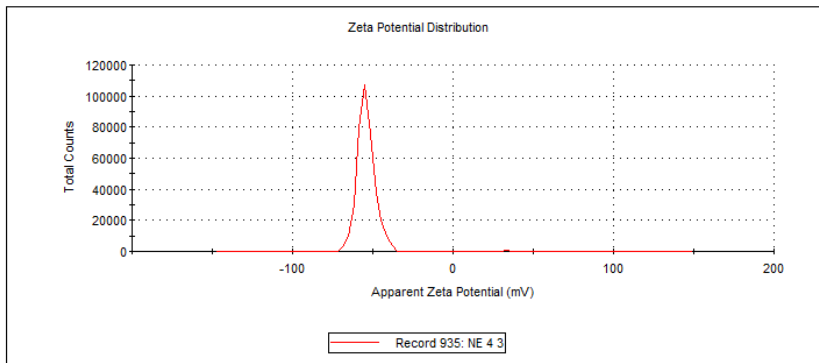


Sample Name: NE 4 3
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Rachel_LTE.dts
Record Number: 935
Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 2022 08:00:00
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 0,8872
Dispersant Dielectric Constant: 78,5

Temperature (°C): 25,0
Count Rate (kcps): 72,9
Cell Description: Clear disposable zeta cell
Zeta Runs: 16
Measurement Position (mm): 2,00
Attenuator: 11

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -54,1	Peak 1: -54,2	99,9	5,46
Zeta Deviation (mV): 6,21	Peak 2: 33,5	0,1	4,77e-7
Conductivity (mS/cm): 0,0820	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : [See result quality report](#)



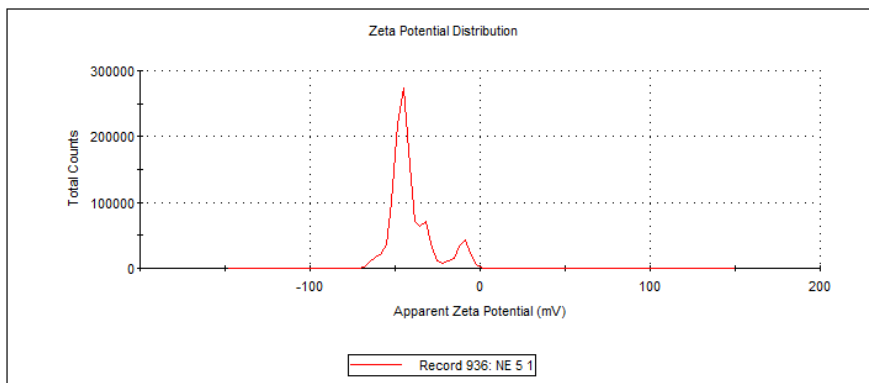
NE_2.5E

Sample Name: NE 5 1
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Rachel_LTE.dts
Record Number: 936
Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 2022 08:00:00
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 0,8872
Dispersant Dielectric Constant: 78,5

Temperature (°C): 25,1
Count Rate (kcps): 56,0
Cell Description: Clear disposable zeta cell
Zeta Runs: 23
Measurement Position (mm): 2,00
Attenuator: 10

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -40,7	Peak 1: -46,0	75,1	5,84
Zeta Deviation (mV): 12,7	Peak 2: -31,7	14,4	3,41
Conductivity (mS/cm): 0,0414	Peak 3: -11,0	10,4	4,76

Result quality : [See result quality report](#)

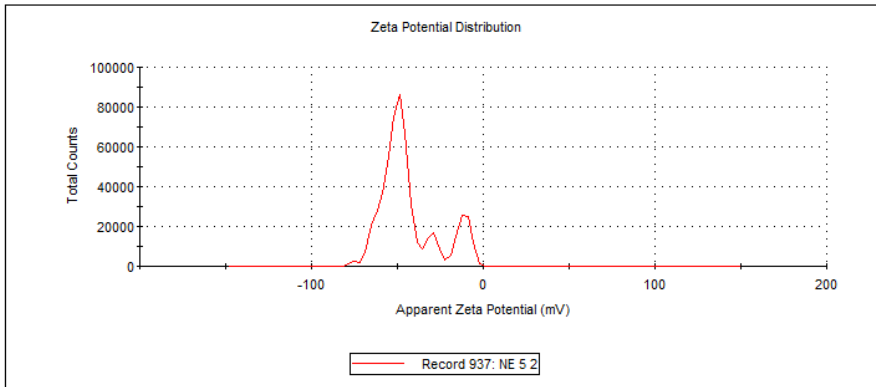


Sample Name: NE 5 2
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Rachel_LTE.dts
Record Number: 937
Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 2022 08:00:00
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 0,8872
Dispersant Dielectric Constant: 78,5

Temperature (°C): 25,0
Count Rate (kcps): 55,9
Cell Description: Clear disposable zeta cell
Zeta Runs: 18
Measurement Position (mm): 2,00
Attenuator: 10

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -43,8	Peak 1: -51,5	74,8	7,25
Zeta Deviation (mV): 16,5	Peak 2: -11,7	15,3	4,26
Conductivity (mS/cm): 0,0484	Peak 3: -29,9	8,9	3,68

Result quality : See result quality report

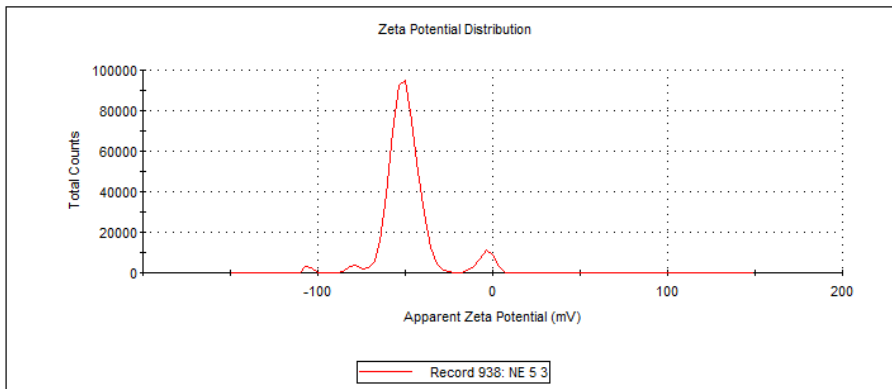


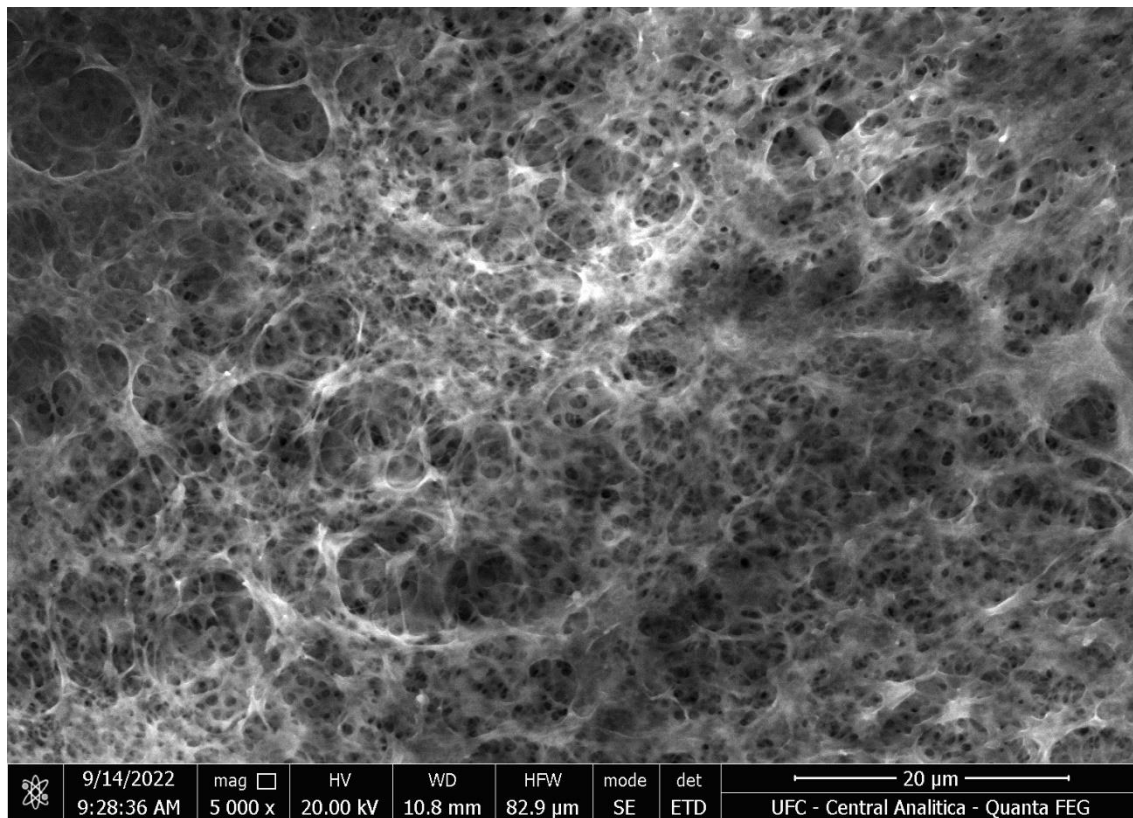
Sample Name: NE 5 3
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Rachel_LTE.dts
Record Number: 938
Date and Time: terça-feira, 20 de setembro de 2022 08:00:00
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1,330
Viscosity (cP): 0,8872
Dispersant Dielectric Constant: 78,5

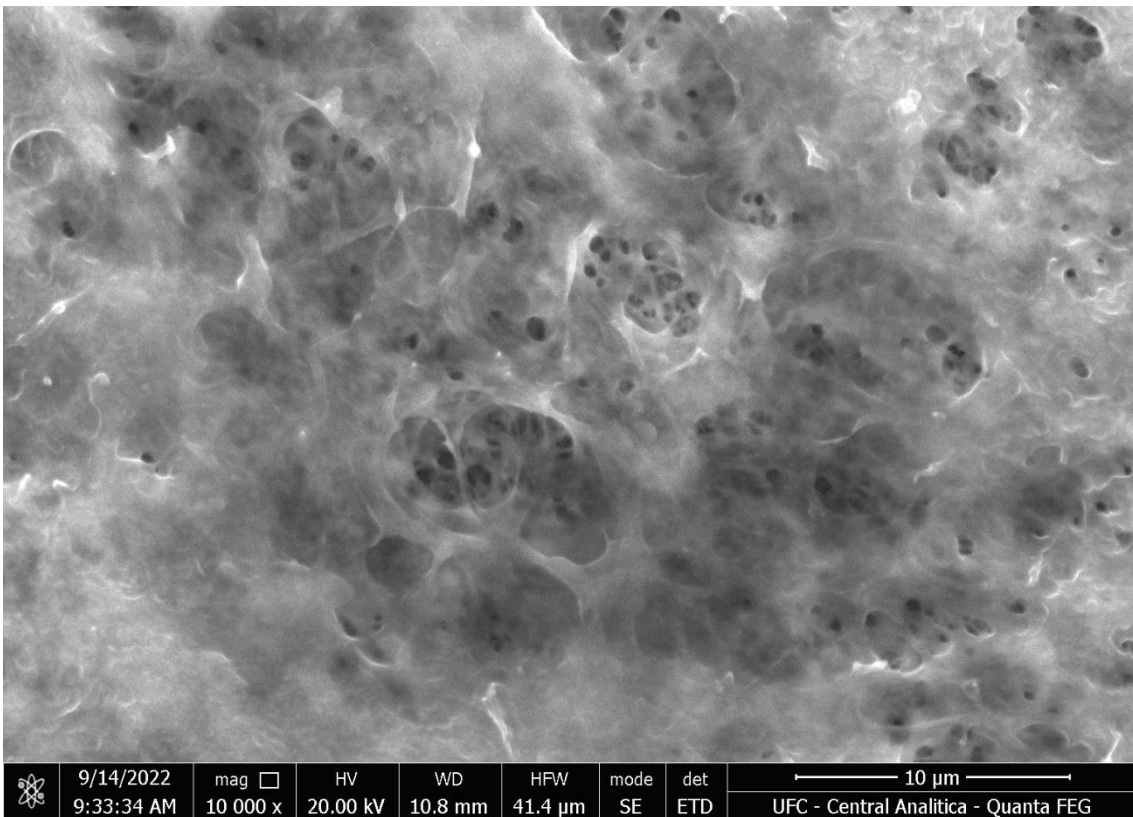
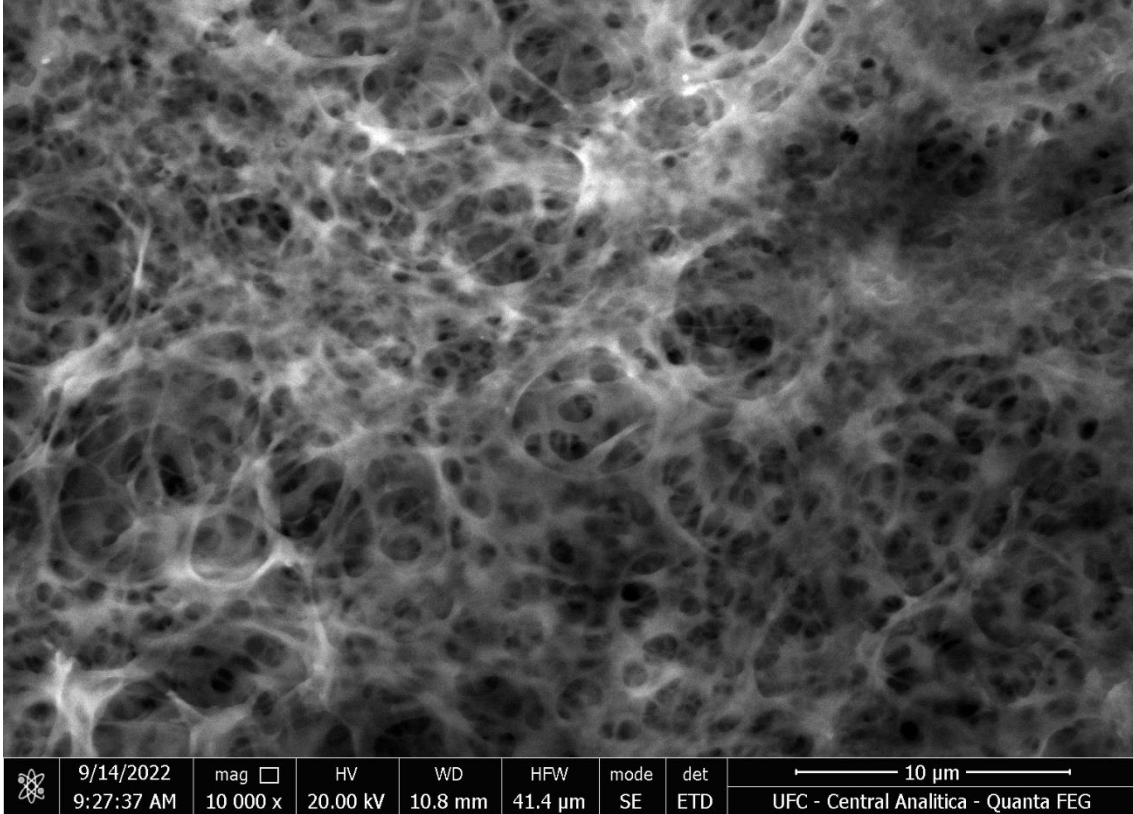
Temperature (°C): 24,9
Count Rate (kcps): 47,5
Cell Description: Clear disposable zeta cell
Zeta Runs: 15
Measurement Position (mm): 2,00
Attenuator: 10

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -48,8	Peak 1: -50,8	91,0	7,49
Zeta Deviation (mV): 15,1	Peak 2: -4,06	6,3	4,61
Conductivity (mS/cm): 0,0740	Peak 3: -79,2	1,6	3,10

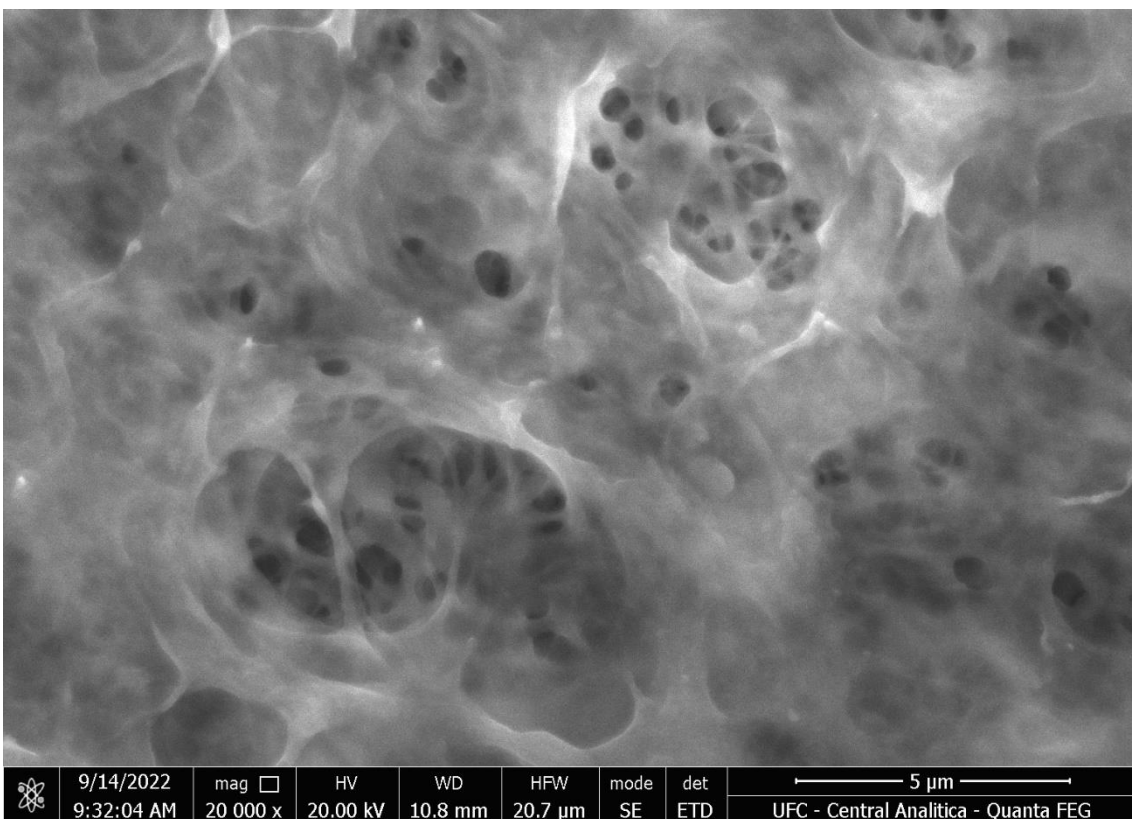
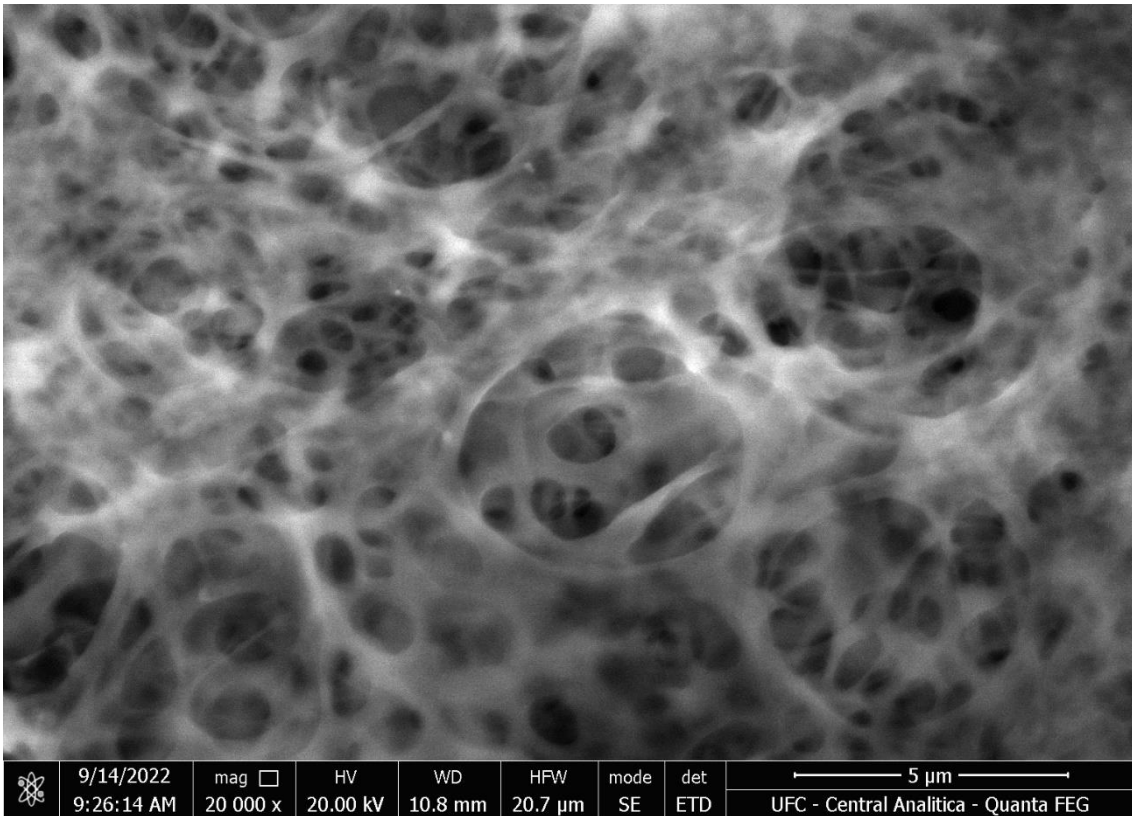
Result quality : See result quality report

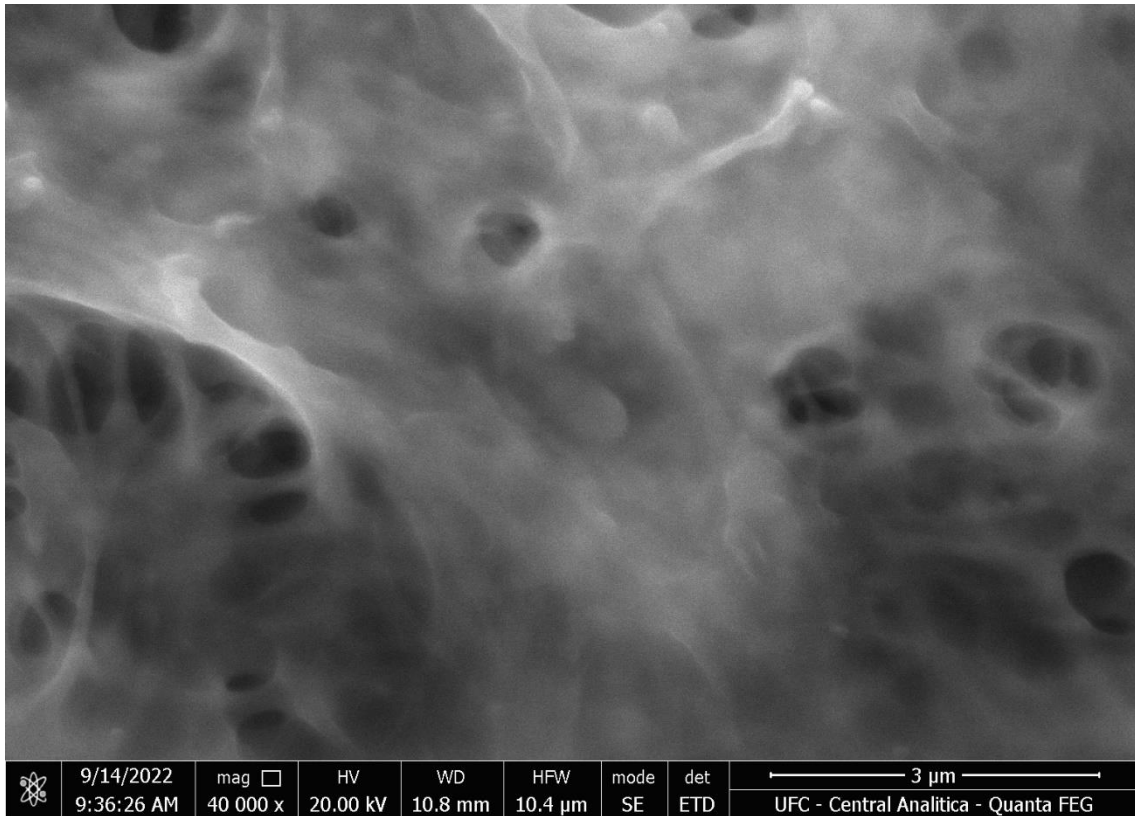
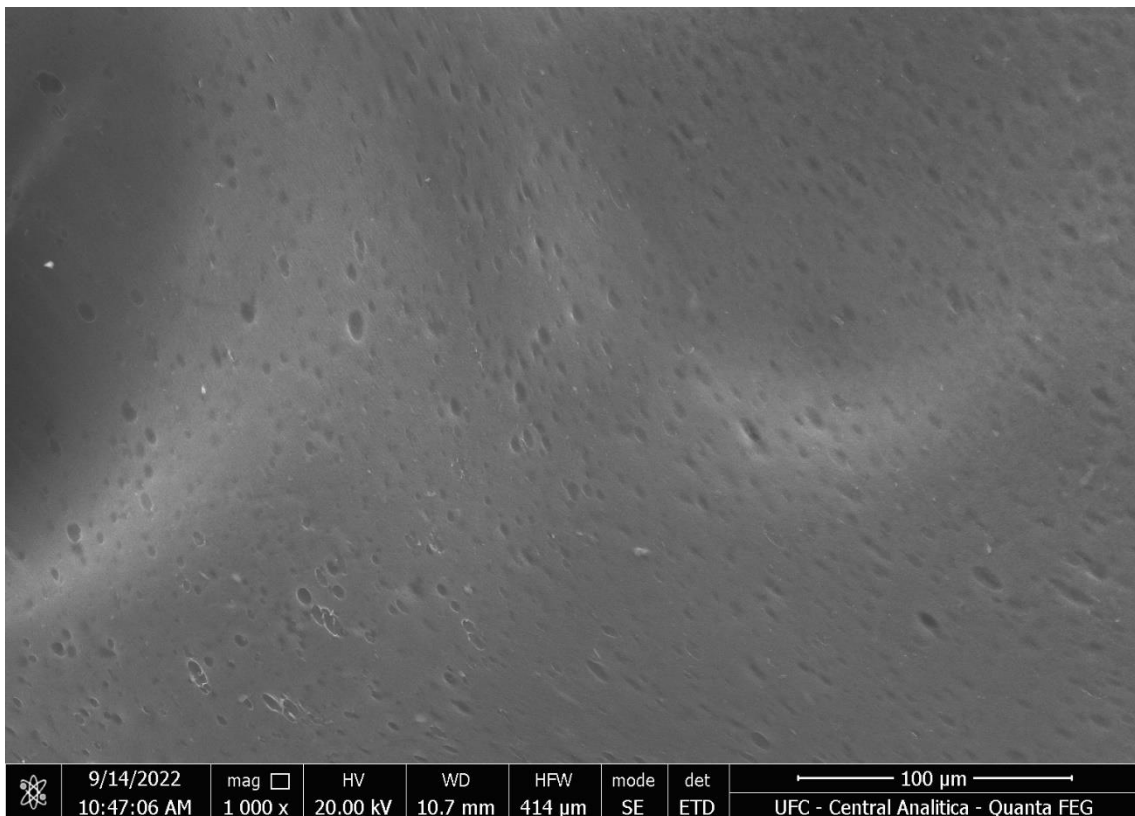


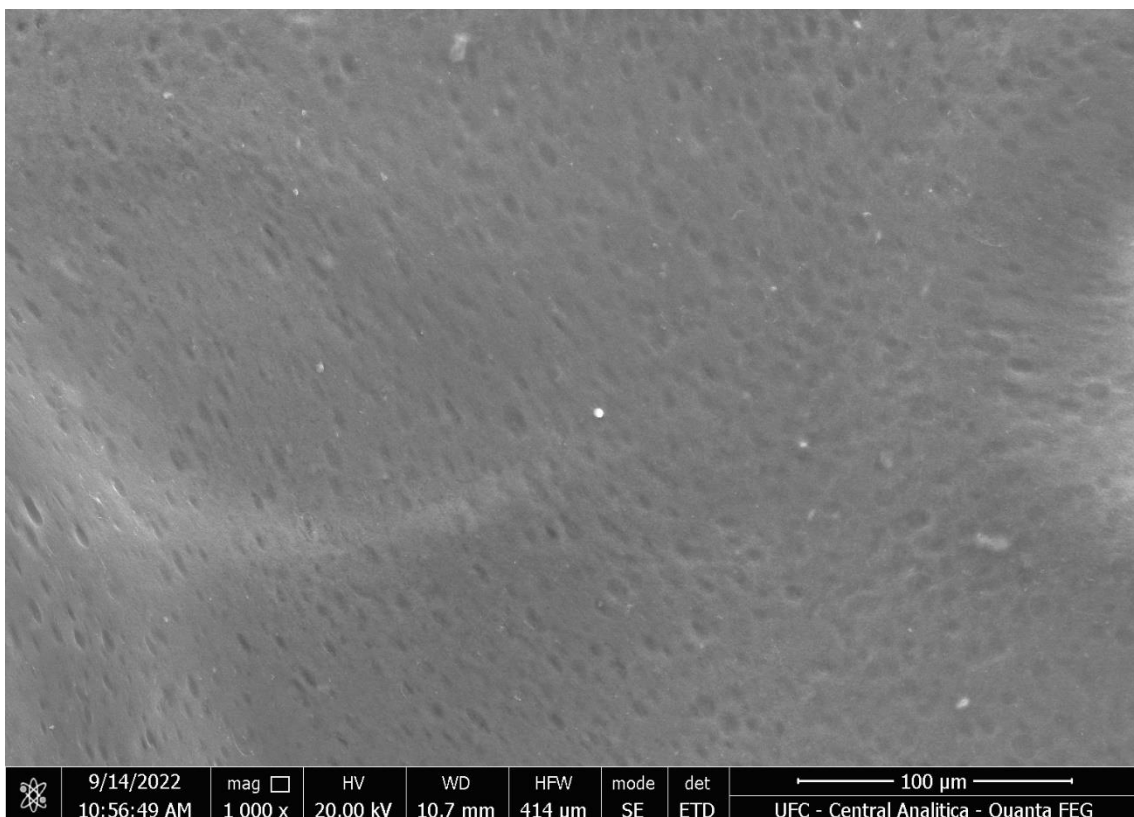
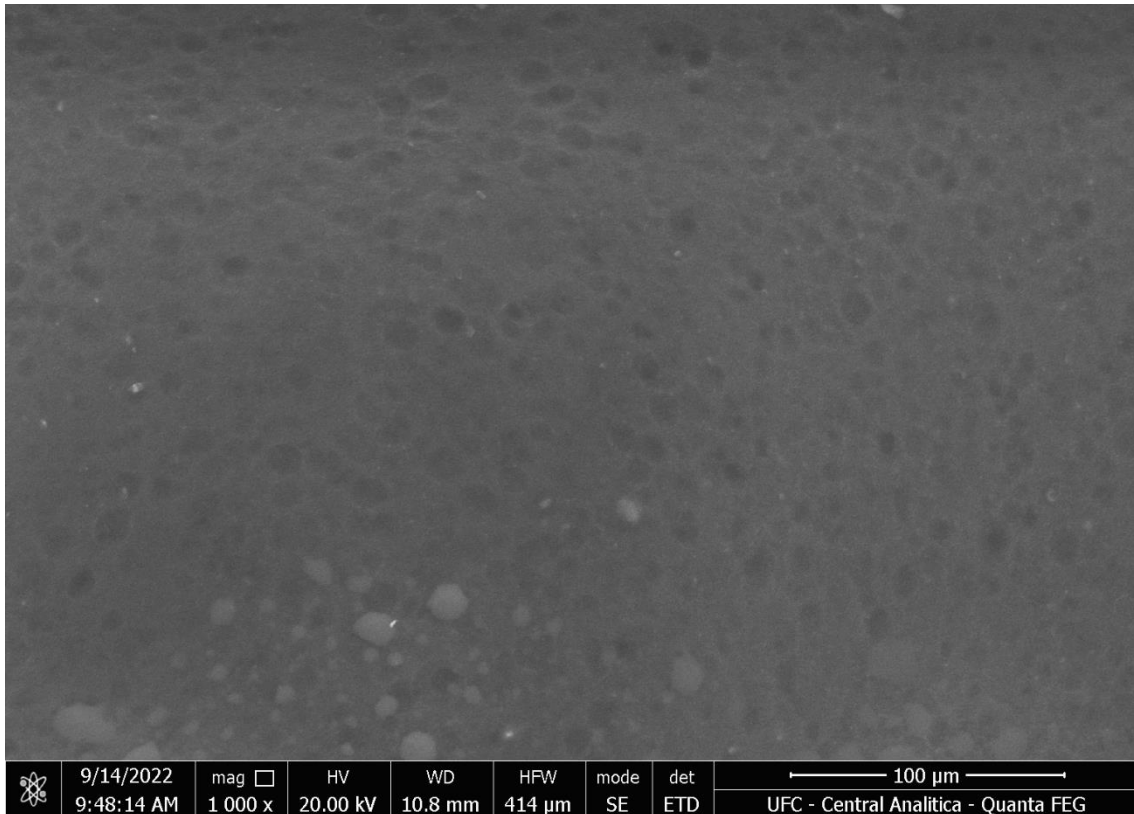
**ANEXO D – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA
DAS NANOEMULSÕES****NE_5GE****5.000X**

10.000X

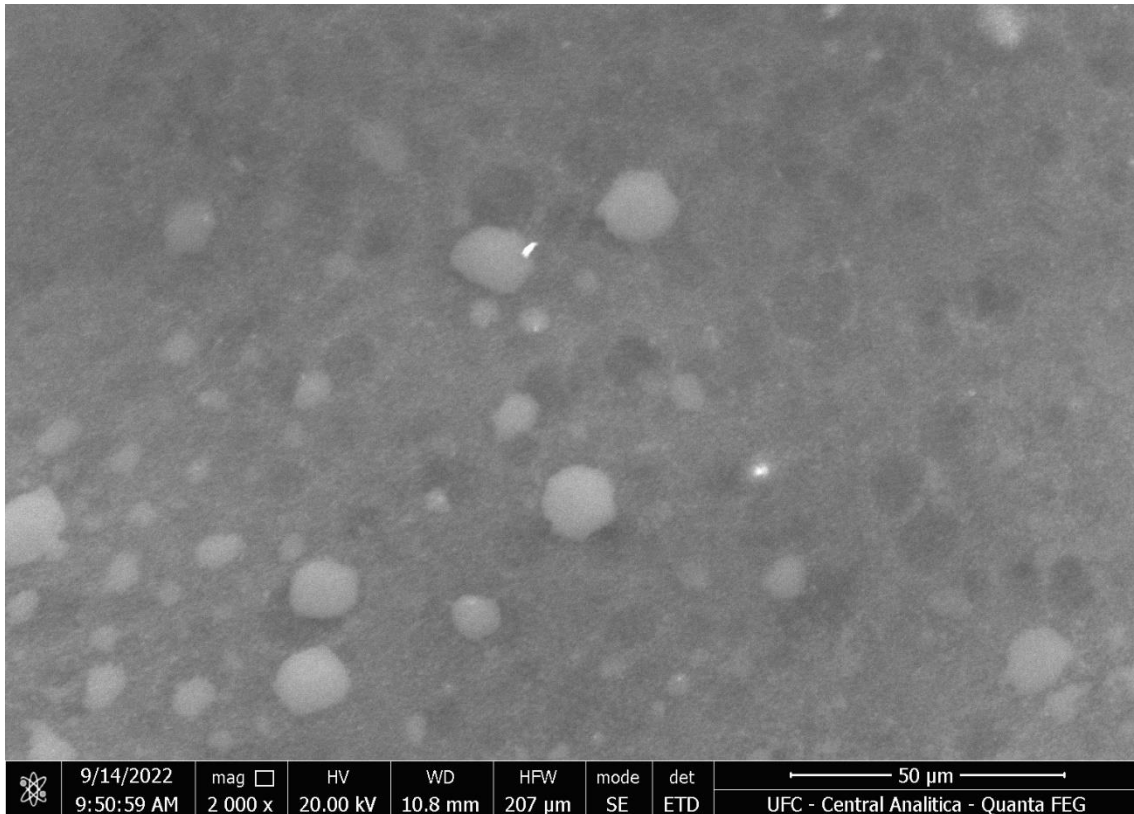
20.000X



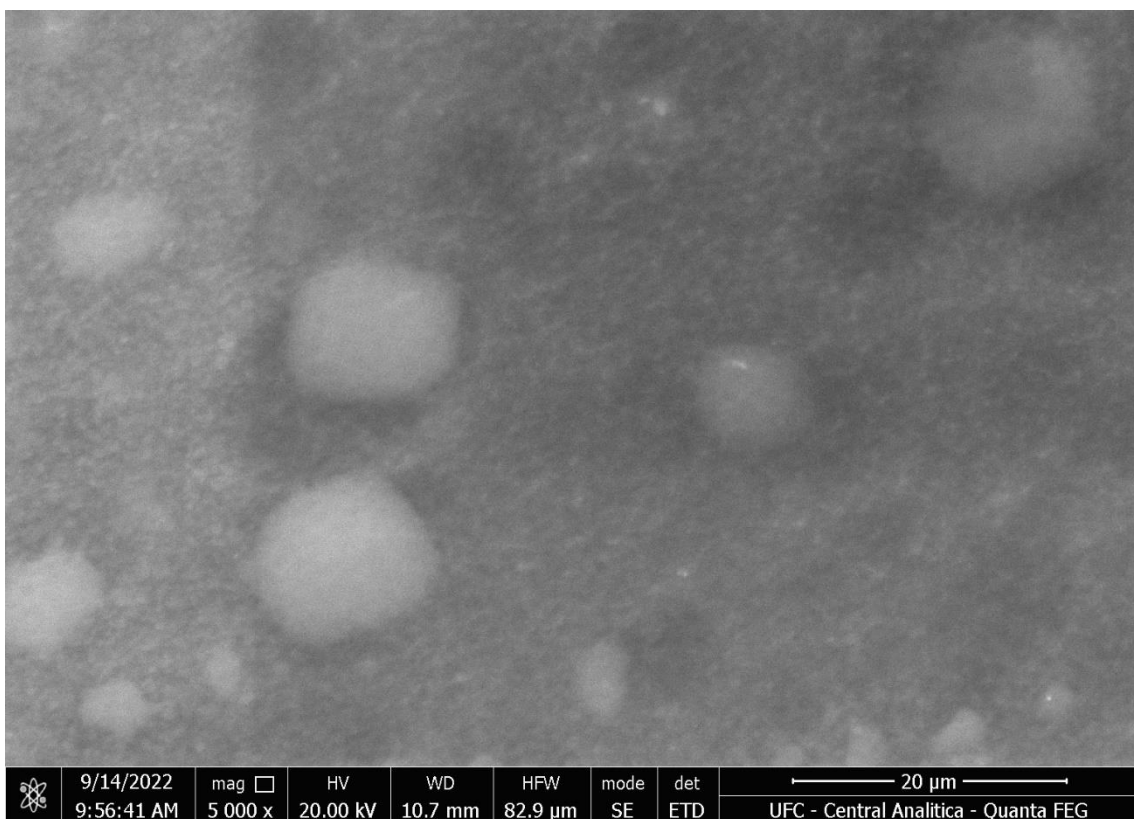
40.000X**NE_5R****1.000X**

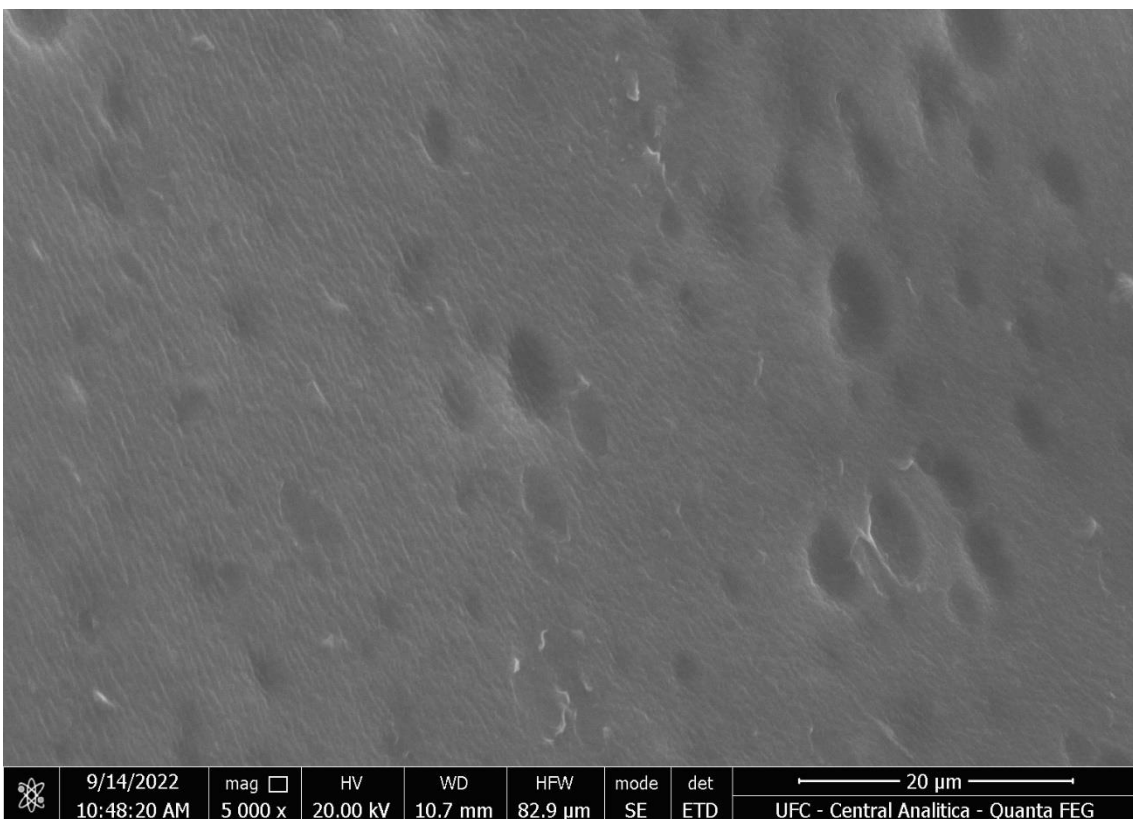
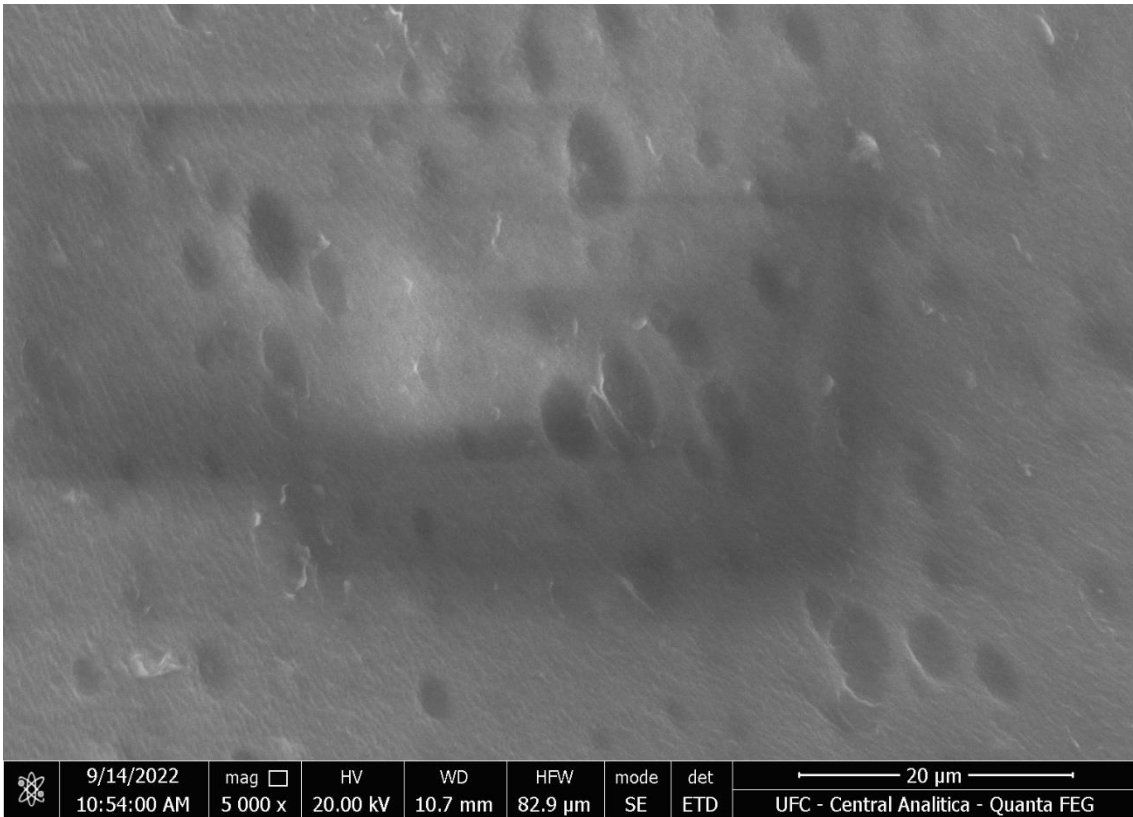


2.000X

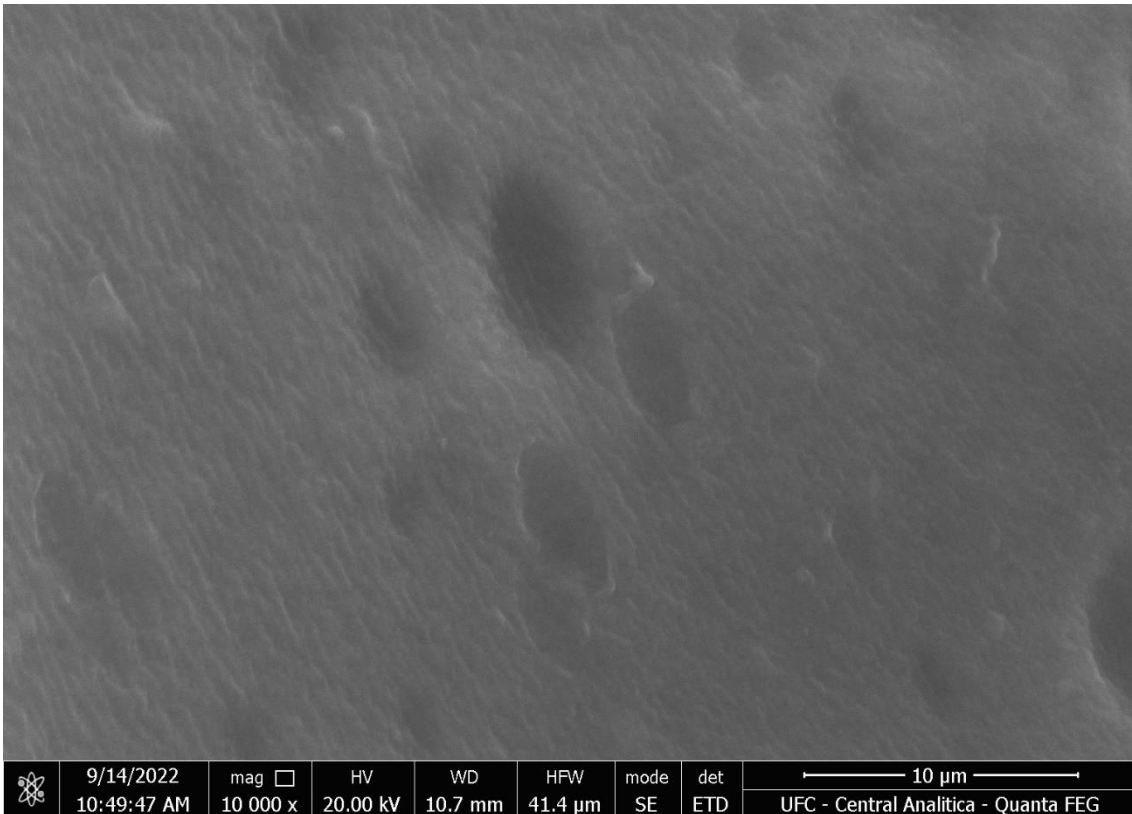


5.000X

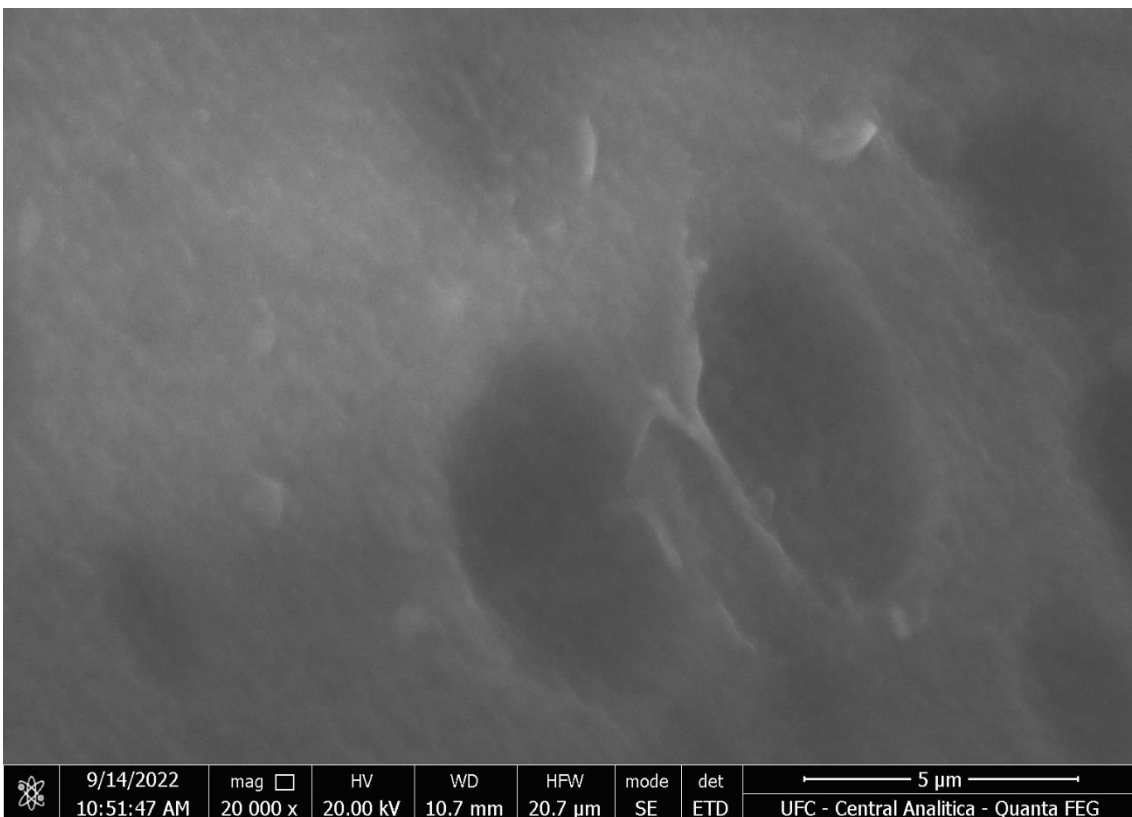




10.000X



20.000X



ANEXO E – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO FUNGIDA MÍNIMA DE TODAS NANOEMULSÕES DE *L. origanoides* FRENTE À *C. albicans*

Nanoemulsão	<i>Candida albicans</i>			
	ATCC 90028		LABMIC O102	
	CIM (mg/mL)	CFM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CFM (mg/mL)
NE_10GE	0,078	0,156	0,078	0,078
NE_5GE	0,156	0,625	0,156	0,156
NE_2.5GE	*	*	*	*
NE_5R	0,156	0,156	0,156	0,156
NE_2.5E	*	*	*	*
NE_2.5G	*	*	*	*
NE__0GE	*	*	*	*

*Não apresentou concentração inibitória/fungicida mínima.