

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA

HELDERY SOARES DE ALUSTAU

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS DE ÓLEO ESSENCIAL DA *Chamomilla recutita* E
CLOREXIDINA COM POTENCIAL APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE
QUEIMADURAS

SAPIENTIA AEDIFICAT

JOÃO PESSOA

2023

HELDERY SOARES DE ALUSTAU

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS DE ÓLEO ESSENCIAL DA *Chamomilla recutita* E
CLOREXIDINA COM POTENCIAL APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE
QUEIMADURAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Centro de Ciências Médicas, da
Universidade Federal da Paraíba, como parte
dos requisitos para se obter o título de bacharel
em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti
Bonan

JOÃO PESSOA

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A471a Alustau, Helderly Soares de.

Atividade antimicrobiana de carreadores lipídicos
nanoestruturados de óleo essencial da Chamomilla
Recutita e Clorexidina com potencial aplicação no
tratamento de queimaduras / Helderly Soares de Alustau.

- João Pessoa, 2023.

37 f.

Orientação: Paulo Rogério Ferreti Bonan.

Coorientação: Quemuel Pereira da Silva.

TCC (Graduação) - UFPB/CCM.

1. Queimaduras. 2. Nanotecnologia. 3. Camomila. 4.
Clorexidina. I. Bonan, Paulo Rogério Ferreti. II.
Silva, Quemuel Pereira da. III. Título.

UFPB/CCM

CDU 616.5:615

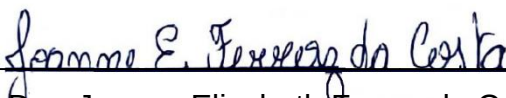
HELDERY SOARES DE ALUSTAU

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS DE ÓLEO ESSENCIAL DA *Chamomilla recutita* E
CLOREXIDINA COM POTENCIAL APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE
QUEIMADURAS**

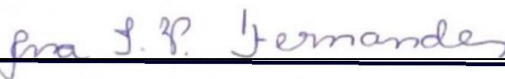
A comissão examinadora abaixo relacionada julgou a defesa de Trabalho de Conclusão de Curso apresentada em sessão pública no dia 26 de Maio de 2023 e atribuiu o conceito aprovado.



Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan
Orientador - UFPB



Profa. Dra. Joanne Elizabeth Ferraz da Costa
Examinador - UFPB



Prof. Dra. Ana Isabel Vieira Fernandes
Examinador - UFPB

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos e provações colocadas em minha vida, pois por mais que o caminho tenha sido árduo, e só Deus sabe o quanto foi, sua misericórdia e presença de pai nunca faltou em minha vida.

Aos meus pais, Maria Soares de Alustau e Luis Godoi de Alustau, pois apesar do contexto social que viviam, o qual os fez ter que trabalhar ao invés de estudar, sempre fizeram de tudo para que nada faltassem aos seus filhos, e sempre incentivaram os mesmos a estudar, sem que nenhuma outra obrigação fosse maior do que a de ir todos os dias para a escola, sem cobranças, mas sempre com muito incentivo, sempre vou ser grato e em qualquer lugar que for, todas as minhas conquistas sempre serão frutos que vocês plantaram.

Ao meu orientador, Paulo Rogério Ferreti Bonan, que é uma referência não só em sua área de atuação como professor, como orientador, como ser humano. Uma pessoa ímpar, agraciada por Deus com uma inteligência inspiradora e uma humildade sem igual, por onde passa não há quem não seja cativado por seu jeito de ser.

Aos professores que compõe a banca examinadora, Dra. Joanne Elizabeth Ferraz da Costa e a Dra Ana Isabel Vieira Fernandes. Que são profissionais incríveis, tanto na docência quanto na prática clínica, que fazem a medicina continuar sendo aquela que tanto encheu meus olhos e me fez a certeza em querer um dia ser médico.

Aos meus amigos que vieram comigo desde a época da fisioterapia e entraram na minha vida de uma forma que não me imaginaria sem eles hoje em dia, em especial Maria Isabel, Joérika Pacífico, Brenda Lopes.

Aos meus amigos que fizeram parte da minha história e que de certa forma creio que muita coisa em minha trajetória eu devo a vocês, principalmente Antonieta Florêncio, Talita Nayara.

Aos meus amigos que fiz durante o curso, não só da medicina, como também de praticamente todo o CCS, em especial à Brenda Fernandes, Herisson Rodrigues, Ana Beatriz Medeiros, Manoel Mariano, Henryton, Erivar, Marcela Lukerli, Amanda Melo, Maria Vitória e Paula Nogueira por me acompanharem nessa trajetória e sempre me ajudarem em todos os momentos, quero muito levar vocês para além das quatro paredes da UFPB, e sim para vida

Ao meu grande amigo, queria agradecer imensamente, um cara incrível que me ajudou em todos os momentos, que Deus, em sua infinita graça, possa te abençoar e iluminar todos os teus passos, Quemuel Pereira, não tenho como descrever o irmão que você foi para mim, o quanto eu serei eternamente grato por todos os conselhos e por todo apoio que você me deu, peço desculpas por todas as vezes que te estressei e que apesar de mais velho fiz o papel de irmão mais novo, imaturo, em que diversas vezes você teve que corrigir e orientar. Meu muito obrigado.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
2. MÉTODOS	10
2.1. Caracterização do óleo de <i>C. recutita</i> por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)	10
2.2. Caracterização <i>in silico</i> através do <i>docking</i> molecular do α -bisabolol	10
2.3. Desenvolvimento dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN).....	11
2.3.1. Materiais utilizados	11
2.3.2. Desenvolvimento	12
2.4. Estudos de pré-formulação dos CLN	13
2.5. Desenvolvimento das formulações de CLN com óleo essencial da <i>C. recutita</i> e Clorexidina	13
2.6. Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta dos CLN carreados com óleo essencial da <i>C. recutita</i> e clorexidina	14
2.7. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	14
2.8. Concentração inibitória mínima (CIM) dos CLN e dos ativos livres contra cepas de <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	15
2.9. Avaliação do efeito de associação do óleo essencial da Camomila e clorexidina	16
3. RESULTADOS	16
3.1. Caracterização do óleo essencial da Camomila por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)	16
3.2. Caracterização <i>in silico</i> através do <i>docking</i> molecular do α -bisabolol	17
3.3. Desenvolvimento dos CLN.....	22
3.4. Estudos de pré-formulação do CLN	22
3.5. Desenvolvimento das formulações de CLN com óleo essencial da Camomila e Clorexidina	23
3.6. Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta dos CLN carreados com óleo essencial de <i>C. recutita</i> e Clorexidina.....	24

3.7. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	25
3.8. Concentração inibitória mínima (CIM) dos CLN e dos ativos livres contra cepas de <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	27
3.9. Avaliação do efeito de associação do óleo essencial da Camomila e Clorexidina	28
4. DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÃO.....	31
Referências	31

Artigo formatado segundo as normas de submissão da revista: Anais Brasileiros de Dermatologia - Elsevier

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS DE ÓLEO ESSENCIAL DA *Chamomilla recutita* E
CLOREXIDINA COM POTENCIAL APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE
QUEIMADURAS**

Heldery Soares de Alustau¹, Paulo Rogério Ferreti Bonan²

¹Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal da Paraíba; ²Departamento de Odontologia e Clínica Social, Universidade Federal da Paraíba.

Resumo

Introdução: O uso do óleo essencial da *Chamomilla recutita*, associado à clorexidina, encapsulados em sistemas manométricos, pode ser uma opção promissora para o manejo de queimaduras por suas propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana e cicatrizante. **Objetivo:** analisar a composição química do óleo da *Chamomilla recutita* e avaliar suas propriedades anti-inflamatória e cicatrizante *in silico*, incorporar esses ativos em Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN), caracterizar o nanossistema e avaliar suas propriedades antimicrobianas *in vitro*. **Métodos:** Foi realizada a análise de composição do óleo essencial por meio da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), avaliada a atividade anti-inflamatória e cicatrizante do α -bisabolol *in silico* por meio do *docking molecular*. Os CLN foram desenvolvidos e realizados estudos de pré-formulação, análise do tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e atividade antimicrobiana *in vitro*. **Resultados:** o α -bisabolol foi o principal constituinte do óleo. O *docking molecular* demonstrou predição de afinidade do α -bisabolol para os alvos avaliados. O estudo de pré-formulação permitiu a previsão de boas características estruturais. Foram observadas partículas entre 86.8 e 257.8 nm e potenciais zeta entre -12.3 a +12.7. O FTIR confirmou a encapsulação dos ativos e foi observada ação antimicrobiana potencializada dos mesmos quando encapsulados. **Conclusão:** Foi possível o desenvolvimento de um novo sistema para o encapsulamento do óleo da Camomila e da Clorexidina com partículas dentro da escala nanométrica e atividade

antimicrobiana *in vitro* potencializada, tendo seu uso visto como promissor no manejo de queimaduras e prevenção de infecções secundárias.

Palavras - chave: Queimaduras; Nanotecnologia; Camomila; Clorexidina.

\

Abstract

Introduction: The use of *Chamomilla recutita* essential oil, associated with chlorhexidine, encapsulated in manometric systems, may be a promising option for the management of burns due to its anti-inflammatory, antimicrobial and healing properties. **Objective:** To analyze the chemical composition of *Chamomilla recutita* oil and evaluate its anti-inflammatory and healing properties *in silico*, to incorporate these actives in nanostructured lipid carriers (NLC), to characterize the nanosystem and to evaluate its antimicrobial properties *in vitro*. **Methods:** The essential oil composition was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), and the anti-inflammatory and healing activity of α -bisabolol was evaluated *in silico* by molecular docking. CLNs were developed and pre-formulation studies, size analysis, polydispersity index, zeta potential, fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and *in vitro* antimicrobial activity were performed. **Results:** α -bisabolol was the main constituent of the oil. Molecular docking demonstrated affinity prediction of α -bisabolol for the evaluated targets. The pre-formulation study allowed prediction of good structural characteristics. Particles were observed between 86.8 and 257.8 nm and zeta potentials between -12.3 to +12.7. FTIR confirmed the encapsulation of the actives and it was observed potentiated antimicrobial action of them when encapsulated. **Conclusion:** It was possible to develop a new system for the encapsulation of Chamomile oil and Chlorhexidine with particles within the nanometric scale and potentiated antimicrobial activity *in vitro*, and its use is seen as promising in the management of burns and prevention of secondary infections.

Keywords: Burns; Nanotechnology; Chamomile; Chlorhexidine.

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as queimaduras são um problema de saúde global, sendo responsável por cerca de 180.000 mortes por ano [1,2]. Estas podem ser classificadas de acordo com seu grau de acometimento e complexidade do tratamento em de 1º, 2º e 3º grau, sendo as de 1º grau restritas a epiderme, as de 2º grau até a região da derme, e as de 3º grau que ultrapassam a derme podendo alcançar estruturas subjacentes [3,4].

O tratamento das queimaduras se mostra desafiador, em decorrência não só das lesões apresentadas, mas também pelas complicações associadas [5]. Segundo Fernandes (2012)[5], a complicação mais comumente observada em crianças e adolescentes vítimas de queimaduras durante o período de internação em unidade hospitalar foi a infecção secundária (12,1% dos pacientes).

Nesse contexto, os produtos naturais surgem como uma linha de manejo aos pacientes vítimas de queimaduras. A *Chamomilla recutita*, conhecida popularmente como camomila alemã, é utilizada há séculos em decorrência de suas funções antiespasmódica, anti-inflamatória sedativa, antimicrobiana e antifúngica; sendo o (-)- α -bisabolol um dos grandes responsáveis pelas ações anti-inflamatória e antiespasmódica[6]. Os óleos essenciais extraídos da Camomila contêm inúmeros compostos com propriedades bioativas, tais como monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos e ácidos graxos [7].

Ainda levando em consideração as infecções secundárias como as principais complicações associadas às queimaduras, o uso de um agente antimicrobiano de segurança biológica bem estabelecida, com boa substantividade e de baixo custo como o digluconato de clorexidina somado ao uso da camomila, poderia corroborar com o potencial antimicrobiano, reduzir sua posologia e conseqüentemente sua possível citotoxicidade [8–10].

A aplicação tópica da Camomila, em sua forma oleosa, e da Clorexidina apenas em seu veículo convencional, com tamanhos moleculares micrométricos, têm efeito transitório, menor biodisponibilidade, penetração, retenção e tempo de contato. Em contrapartida, a incorporação dessas substâncias em Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) permite o controle da liberação de ativos, manutenção das características físico-químicas dos mesmos e, devido as suas

dimensões, podem assegurar melhor penetração e retenção na superfície de aplicação [8,11–13].

Assim, o presente estudo objetivou avaliar *in silico* o potencial anti-inflamatório e cicatrizante do α -bisabolol, incorporar o óleo da *C. recutita* e a clorexidina em CLN, caracterizar físico-quimicamente o nanossistema e avaliar *in vitro* suas propriedades antimicrobianas.

2. MÉTODOS

2.1. Caracterização do óleo de *C. recutita* por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

A composição química do óleo da *C. recutita* foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas realizada em um instrumento da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP 2010 Ultra com coluna da marca RTX-5MS capilar (5% Difenil / 95% dimetilpolisiloxano) com tamanho de 30 mm (comprimento) / 0.25 mm de diâmetro Interno / 0.25 μ m. A temperatura inicial da coluna variou de 60°C a 90°C a 5°C/min, permanecendo a 90°C por 15 minutos e de 90°C a 280°C a 20°C/min. A temperatura do injetor e do detector foram 260 e 280°C, respectivamente. O tempo total de corrida foi de 80 minutos e o volume de injeção foi de 1,0 μ L. A identificação dos constituintes foi realizada por meio de busca de dados encontrados na literatura e biblioteca do equipamento (Bancos de Dados: NIST2008 | NIST2008+Shimadzu | FFNSC 1.3).

2.2. Caracterização *in silico* através do *docking* molecular do α -bisabolol

As estruturas do α -bisabolol (CID: 1549992) e dos fármacos padrões (Ibuprofeno – CID: 3672, desoximetasona – CID: 5311067 e sulfadiazina – CID: 5215) foram baixadas do banco de dados de estruturas químicas PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Os alvos 6Y8M (Fragmento de biquinina ligado à Interleucina 1 β), 2AZ5 (Estrutura cristalina do TNF- α com um inibidor de molécula pequena), 1CX2 (ciclooxigenase-2 complexada com um inibidor seletivo), 1KVO (fosfolipase α 2 humana complexada com um substrato análogo altamente potente), 1SVC

(homodímero nfkb p50 ligado ao dna), 4KIK (I κ B quinase beta humana), 1FLT (VEGF em complexo com domínio 2 do receptor FLT-1 [fator de crescimento endotelial vascular]), 6B8Y (domínio de quinase tipo 1 do receptor TGF- β (T204D) em complexo com N-(3-fluoropiridin-4-il)-2-[6-(trifluorometil)piridin-2-il]-7H-pirrólo[2,3-d]pirimidin-4-amina [Fator de crescimento transformador beta) e 1Q7D (Estrutura do peptídeo de colágeno de ligação à integrina alfa2beta1 [colágeno α 1]), foram baixados do *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) por meio dos seus respectivos IDs, em formato PDB. Seus ligantes e os receptores foram submetidos ao *docking* molecular utilizando o Molegro Virtual Docker, versão 6.0.1 (MVD)[14]. As proteínas e as estruturas do ligante foram preparadas usando as configurações padrões contidas no pacote do software (função Score: MolDock Score; avaliação Ligand: Internal ES, Internal Hbond, Sp2-Sp2 Torsions, todas verificadas; Number of runs: 10 execuções; algoritmo: MolDock SE; interações máximas: 1500; tamanho máximo da população: 50; etapas máximas: 300; fator de distância do vizinho: 1,00; número máximo de poses retornadas: 5).

As estruturas do ligante e receptor foram preparadas no software PyRx 0.9. Uma caixa de grade tridimensional com 50, 44 e 50 pontos para x, y e z com um espaçamento de 0,375Å foi criada. O procedimento de acoplamento foi realizado usando uma GRID de 15Å° em raio e resolução de 0,30. As simulações de acoplamento foram realizadas no software AutoDock 4.2. As moléculas foram salvas no formato PDB usando o software Molegro. Todos os outros parâmetros seguiram as configurações padrão do AutoDock 4.2.

Os resultados para cada cálculo foram analisados com o intuito de se obter os menores valores de energia de afinidade (Kcal/mol) para cada conformação do ligante em seu respectivo complexo, correspondendo aos complexos mais estáveis. As imprecisões da estrutura foram ignoradas nos cálculos.

2.3. Desenvolvimento dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)

2.3.1. Materiais utilizados

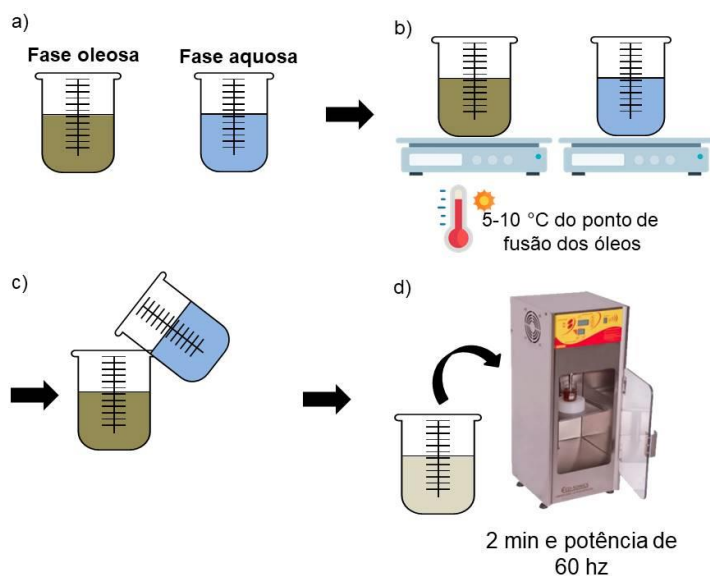
Diestearato de glicerila (Precirol ATO5 I®, marca); Macrogolglycerol ricinoleate 35 (Cremophor® EL, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); Lipídios de cadeia

média (MCT, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); Polioxietileno (80) monoleato de sorbitano (Polisorbato 80, Tween® 80; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); Água ultrapurificada (Mili-Q® A-10; Merk Millipore, Darmstadt, Alemanha); Cloreto de sódio P.A (Dinâmica®); óleo essencial de Camomila alemã (*Chamomilla recutita*) com método de extração por CO₂ super crítico (Laszlo aromatologia®, Belo Horizonte, MG, Brasil), Clorexidina (Dinâmica®).

2.3.2. Desenvolvimento

Os CLN foram desenvolvidos utilizando-se a técnica de emulsificação a quente seguida de sonicação ultrassônica a partir da confecção de duas fases, uma oleosa (Precirol®, Cremophor® EL e MCT) e uma fase aquosa (água Mili-Q® e Tween 80). As duas fases foram esquentadas em placas de aquecimento até ultrapassarem 5-10°C do ponto de fusão dos óleos ($\pm 70^{\circ}\text{C}$), em seguida a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa, logo após, com a mistura ainda quente, foram levadas para o sonicador ultrassônico (Ultronique®, Indaiatuba-SP) por 2 min em amplitude de 60 Hz.

Figura 5. Ilustração esquemática do desenvolvimento dos CLN.



- a)** Confecção de duas fases, uma oleosa e uma fase aquosa; **b)** As duas fases foram aquecidas em banho Maria até ultrapassarem 5-10°C do ponto de fusão dos óleos; **c)** Em seguida, a

fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa; **d)** A mistura ainda quente foi sonicada em sonificador ultrassônico por 2 min em potência de 60 Hz.

2.4. Estudos de pré-formulação dos CLN

Os estudos de pré-formulação foram realizados a partir da confecção de 5 grupos com concentrações de lipídios e tensoativos diferentes. O propósito foi avaliar as concentrações ideais de lipídeos sólidos e líquidos, constituintes da matriz dos CLN e observar possíveis interações físico-químicas e cristalinidades dos lipídeos.

Após a confecção, as formulações que apresentaram aspecto macroscópico ideal: fluidas e homogêneas, foram analisadas pela técnica de espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletroforética associada à equação de Henry (DLS) (Zetasizer® nano ZS90, Malvern instrumentos, São Paulo, Brasil) através dos parâmetros: tamanho das partículas (D), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ). As amostras foram previamente diluídas com água Mili-Q em proporções que variaram de 1:100 a 1:500 e as análises foram realizadas em triplicata.

A **tabela 1** descreve os lipídios, solventes e tensoativos, bem como, as concentrações utilizadas em cada grupo.

Tabela 1. Concentrações de lipídios, solventes e tensoativos nas 5 formulações teste de CLN.

Componentes	Formulações				
Fase Oleosa (FO, mg)	1	2	3	4	5
Precirol	100	100	50	150	100
Cremophor EL	50	50	50	50	100
MCT	100	300	100	200	300
Fase aquosa (FA, mg)					
Tween	30	30	30	30	50
Água Milli-q (qsp-2mL)	1720	1520	1770	1570	1450

MCT: Lipídios de cadeia média (lipídio líquido).

2.5. Desenvolvimento das formulações de CLN com óleo essencial da *C. recutita* e Clorexidina

Para o desenvolvimento das formulações com os ativos, foi removido o MCT e adicionada a mesma quantidade deste de óleo essencial da *C. recutita* e/ou Clorexidina. As formulações foram desenvolvidas pela mesma técnica de emulsificação a quente seguida de sonicação ultrassônica já descrita no tópico 2.3.2 e seguindo as concentrações observadas como as melhores, segundo o estudo de pré-formulação.

2.6. Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta dos CLN carregados com óleo essencial da *C.recutita* e clorexidina

O D e o PDI foram determinados utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), através do Zetasizer® nano ZS90 (Malvern® instrumentos, São Paulo, Brasil), equipado com um raio laser de 633 nm, com espalhamento óptico fixo a 90°, utilizando cubeta descartável de poliestireno de 10 mm. Amostras foram diluídas utilizando água Milli-Q® e 3 medições foram realizadas a 25°C.

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão[15]. Para determinação do potencial eletrocinético ou PZ, foi realizada a técnica da mobilidade eletroforética associada à equação de Henry, onde as amostras foram diluídas em uma solução de cloreto de sódio a 1 mM e inseridas em cubeta descartável de policarbonato DTS 1060C. Foram feitas 3 determinações para cada análise. Os resultados foram expressos por meio da média $\pm$ desvio padrão.

2.7. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi utilizada com o objetivo de avaliar possíveis interações entre os compostos das formulações e comprovar a incorporação do óleo de *C. recutita* e da clorexidina nas formulações. Os espectros foram adquiridos em um Espectrômetro Spectrum 400 Perkin Elmer (Estados Unidos, Massachusetts) acoplado com acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) equipado com cristal de Zinco Selênio (ZnSe) em um intervalo de 4000–650 cm⁻¹, 32 scans e com uma resolução de 4 cm⁻¹.

2.8. Concentração inibitória mínima (CIM) dos CLN e dos ativos livres contra cepas de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

A técnica de microdiluição realizada com as cepas fúngicas foi feita segundo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002)[16], com algumas modificações. A técnica realizada com as cepas bacterianas foi feita segundo a CLSI (2012)[17]. A suspensão de cepas de *C. albicans* (ATCC 60193) foi ajustada com turbidez equivalente a 10^6 UFC/mL, 530nm, abs 0,08-0,13. Já as suspensões bacterianas foram ajustadas com turbidez equivalente a 5×10^8 UFC/mL, 625nm, abs 0,08-0,10, e após diluídas para concentração de $2,5 \cdot 10^5$ UFC/mL, sendo utilizadas cepas de *S. aureus* (ATCC 15656) e *E. coli* (ATCC 25922).

Para avaliação da atividade antifúngica e antibacteriana por meio da técnica de microdiluição, foram usadas placas de 96 poços de fundo chato esterilizadas contendo caldo Sabouraud dextrose (CSD) e caldo infusão cérebro coração (BHI) estéril, respectivamente. Posteriormente, foram inseridas as substâncias em estudo, o óleo da *C.recutita* (Laszlo aromatologia®, Belo Horizonte, MG, Brasil) e a clorexidina (Dinâmica®, Brasil) não encapsulados, seguido do processo de microdiluição em série, proporcionando avaliação de concentrações que iniciaram em 100 µg/ml e finalizaram em 0,01 µg/ml. Na sequência, foram adicionados os inóculos das cepas fúngicas e bacterianas.

Nistatina (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil) e clorexidina não encapsulada (Dinâmica®, Brasil) na concentração de 0,12%, foram utilizadas como controles positivos. As formulações sem os ativos também foram testadas para observar se as mesmas apresentavam resposta. Foi realizado controle de viabilidade das cepas e de esterilidade do meio de cultura. As placas para avaliação de atividade antifúngica foram incubadas por 48h a 35°C e para a atividade antibacteriana, por 24 horas a 37°C. Os testes foram realizados em triplicata.

O resultado da CIM contra a cepa fúngica foi dado a partir da leitura visual após adição do corante TTC (2,3,5-trifenil tetrazólio cloreto - Sigma-Aldrich) (DESWAL; CHAND, 1997). Já contra cepas bacterianas, as CIMs foram determinadas visualmente através da oxidação-redução do indicador resazurina (0,1%) (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil).

2.9. Avaliação do efeito de associação do óleo essencial da Camomila e clorexidina

Para a formulação combinada, ou seja, com a presença dos dois compostos, foi avaliado o efeito de associação dos mesmos, determinado a partir do método da derivação do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF)[18,19].

O ICIF foi calculado através da soma do CIFA + CIFB (CIFA = Concentração Inibitória Fracionada de um dos compostos; CIFB = Concentração Inibitória Fracionada de um dos compostos). O CIFA foi calculado através da relação CIMA combinado/CIMA isolado, enquanto o CIFB foi calculado através da relação CIMB combinado/CIMB isolado. Este índice foi interpretado da seguinte forma: sinergismo ($ICIF \leq 0,5$), antagonismo ($ICIF > 4,0$) e indiferença ($0,5 \leq ICIF \leq 4$)[18,19].

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização do óleo essencial da Camomila por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

A CG-EM foi usada para tipificação dos compostos presentes no óleo essencial da *C. recutita*. Óleos dessa espécie já foram tipificados em outros trabalhos, porém é de suma importância realizar essas análises, principalmente em óleos vegetais, já que estes apresentam grande variabilidade composicional.

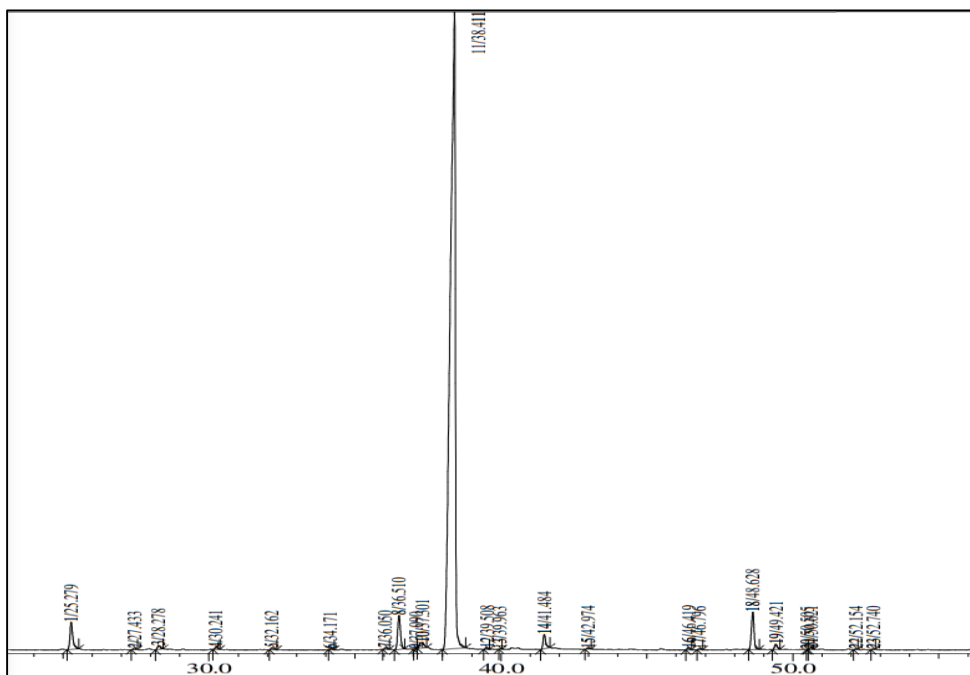


Figura 2. Cromatograma do óleo essencial de Camomila por CG-EM

Componente	Tempo de exposição (min)	de Área (%)
Farneseno	25.279	2.06
β -bisabolol	28.278	0.28
α -bisabolol	38.411	81.86
Pentacosano	68.386	1.22
α - tocoferol	75.866	0.16
Squalene	78.990	0.07

Tabela 2. Principais constituintes do óleo de Camomila obtido por CG-EM.

A **Figura 2** apresenta o cromatograma total após análises do óleo em questão por CG-EM, revelando a presença de um pico principal

O pico principal apresentou tempo de retenção em 38,411 min, sendo identificado como α -bisabolol pela biblioteca de lipídios (**Tabela 2**), que também se apresentou como o principal constituinte do óleo essencial de Camomila (área de 81,86%).

3.2. Caracterização *in silico* através do *docking* molecular do α -bisabolol

Analisaram-se comparativamente, por meio da ancoragem molecular, os valores das energias de ligação do α -bisabolol, assim como, dos fármacos padrões para o tratamento de queimaduras (cicatrizantes e anti-inflamatórios). Sendo todas essas substâncias acopladas separadamente com os seus principais alvos moleculares.

Na **Tabela 3** observam-se os resultados das substâncias acopladas com três alvos envolvidos na cicatrização e com os seis envolvidos na resposta inflamatória.

O estudo de *docking* molecular do α -bisabolol para os alvos envolvidos na resposta inflamatória apresentou valores negativos de energia de ligação, sendo eles: 6Y8M (Fragmento de biquinina ligado à Interleucina 1 β), 2AZ5 (Estrutura cristalina do TNF- α com um inibidor de molécula pequena), 1CX2 (ciclooxygenase-2 complexada com um inibidor seletivo), 1KVO (fosfolipase α 2 humana complexada com um substrato análogo altamente potente), 1SVC (homodímero nfkb p50 ligado ao dna) e 4KIK (I κ B quinase beta humana), com valores de ligação de -62.64; -86.81; -81.30; -44.20; -82.03 e -75.65 Kcal/mol, respectivamente. O Ibuprofeno apresentou valores negativos de energia de -61.74; -84.99; -68.97; -72.55 e -68.40 Kcal/mol, para os alvos 6Y8M, 2AZ5, 1CX2, 1SVC e 4KIK, respectivamente. Já a Desoximetasona apresentou valores negativos de energia de -59.96; -89.76; -89.74; -45.97; -81.15 e -69.80 para os alvos 6Y8M, 2AZ5, 1CX2, 1KVO, 1SVC e 4KIK, respectivamente.

O α -bisabolol também apresentou valores negativos de energia de ligação para todos os alvos envolvidos no processo de reparo que foram avaliados, indicando afinidade com os mesmos, sendo eles: 1FLT (VEGF em complexo com domínio 2 do receptor FLT-1 [fator de crescimento endotelial vascular]), 6B8Y (domínio de quinase tipo 1 do receptor TGF- β (T204D) em complexo com N-(3-fluoropiridin-4-il)-2-[6-(trifluorometil)piridin-2-il]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-amina [Fator de crescimento transformador beta) e 1Q7D (Estrutura do peptídeo de colágeno de ligação à integrina α 2 β 1 [colágeno α 1]), com valores de energia de -81,85; -90.55; -68,02 Kcal/mol, respectivamente. A sulfadiazina, utilizada como padrão e controle dessa análise para o processo de reparo, apresentou energias de ligação para os alvos avaliados de -76.59; -92.70 e -65.79 Kcal/mol, respectivamente.

Ligações formadas entre átomos apolares e pontes de hidrogênio (formadas entre átomos polares) com resíduos de aminoácidos em comum foram observadas para o α -bisabolol em todos os alvos envolvidos no processo inflamatório e de reparo avaliados, com exceção do alvo 2AZ5 (TNF- α), que apresentou apenas ligações estéricas com resíduos de aminoácidos em comum (**Figura 3**).

Os fármacos padrões também apresentaram ligações entre átomos apolares e pontes de hidrogênio com resíduos de aminoácidos em comum para todos os alvos avaliados.

Além disso, pode-se observar melhor afinidade de ligação do α -bisabolol quando comparado ao Ibuprofeno para todos os alvos referentes à resposta inflamatória em que os dois foram avaliados (6Y8M, 2AZ5, 1CX2, 1SVC e 4KIK), bem como, melhor afinidade do α -bisabolol quando comparado a desoximetasona para os alvos 6Y8M, 1SVC e 4KIK, e valores semelhantes para os demais alvos avaliados. Ainda foi observada melhor afinidade de ligação do α -bisabolol para os alvos referentes ao processo de reparo VEGF e TGF— β , quando comparado a sulfadiazina.

Tabela 3. Valores energia de ligação para os compostos estudados e os alvos: 6Y8M (Fragmento de biquinina ligado à Interleucina 1 β), 2AZ5 (Estrutura cristalina do TNF- α com um inibidor de molécula pequena), 1CX2 (ciclooxigenase-2 complexada com um inibidor seletivo), 1KVO (fosfolipase α 2 humana complexada com um substrato análogo altamente potente), 1SVC (homodímero nfkb p50 ligado ao dna), 4KIK (I κ B quinase beta humana), 1FLT (VEGF em complexo com domínio 2 do receptor FLT-1 [fator de crescimento endotelial vascular]), 6B8Y (domínio de quinase tipo 1 do receptor TGF- β (T204D) em complexo com N-(3-fluoropiridin-4-il)-2-[6-(trifluorometil)piridin-2-il]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-amina [Fator de crescimento transformador beta) e 1Q7D (Estrutura do peptídeo de colágeno de ligação à integrina alfa2beta1 [colágeno α 1]).

Fármacos	Alvos de inflamação						Alvos de reparo		
	6Y8M	2AZ5	1CX2	1KVO	1SVC	4KIK	1FLT	6B8Y	1Q7D
α-bisabolol	-62.64	-86.81	-81.30	-44.20	-82.03	-75.65	-81.85	-90.55	-68.02
Ibuprofeno	-61.74	-84.99	-68.97	-	-72.55	-68.40	-	-	-
Desoximetasona	-59.96	-89.76	-89.74	-45.97	-81.15	-69.80	-	-	-
Sulfadiazina	-	-	-	-	-	-	-76.59	-92.70	-65.79

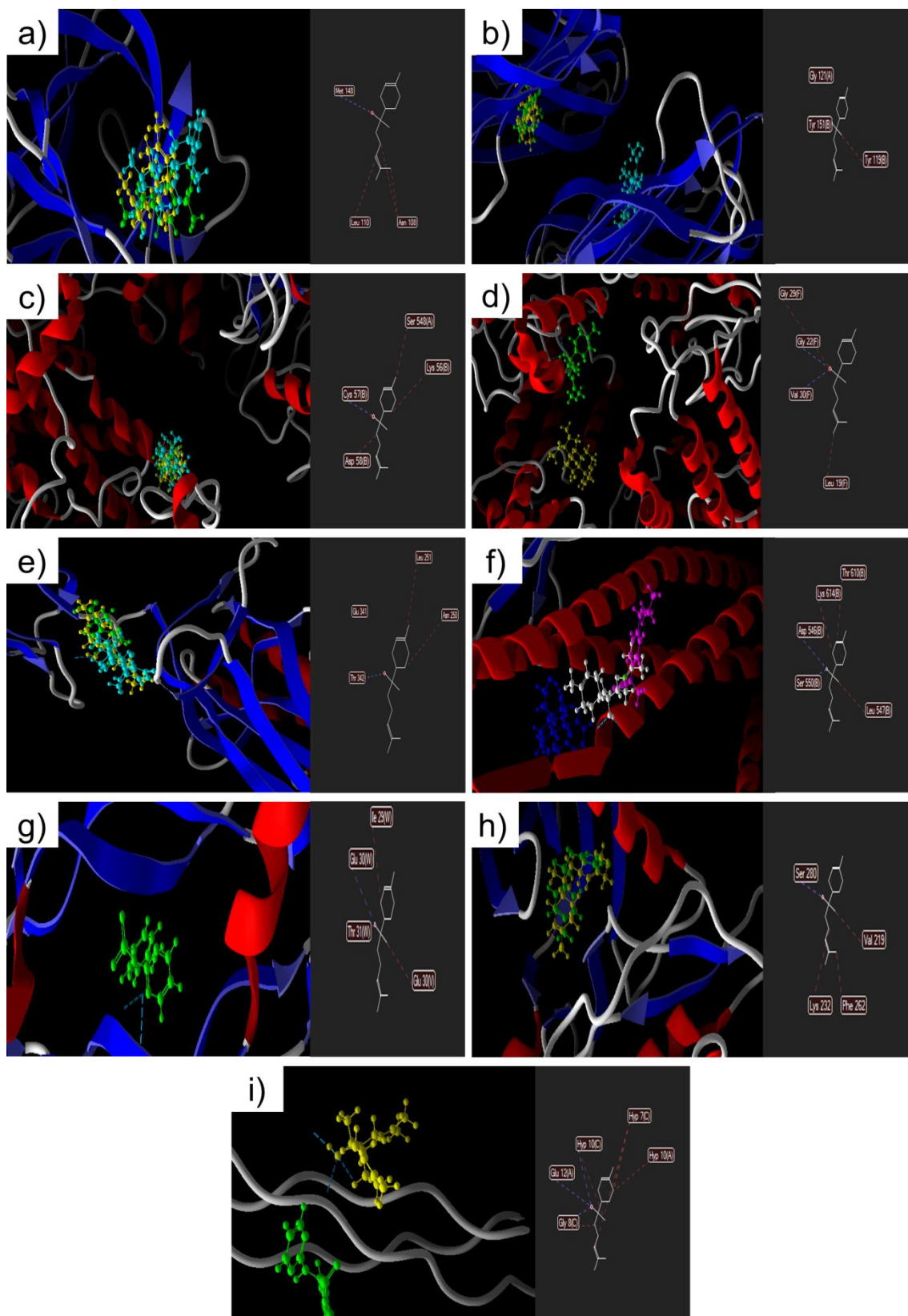


Figura 3. Mapa de interações entre o composto CNM com os alvos em estudo. **a)** Interação α -bisabolol/6Y8M; **b)** Interação α -bisabolol/2AZ5; **c)** Interação α -bisabolol/1CX2; **d)** Interação α -bisabolol/1KVO; **e)** Interação α -bisabolol/1SVC; **f)** Interação α -bisabolol/4KIK; **g)** Interação α -bisabolol/1FLT; **h)** Interação α -bisabolol/6B8Y; **i)** Interação α -bisabolol/1Q7D.

3.3. Desenvolvimento dos CLN

O desenvolvimento dos CLN seguiu a metodologia de emulsificação a quente seguido por sonicação ultrassônica em todas as etapas do estudo. A encapsulação dos lipídios através desse sistema proporcionou CLN com aspecto macroscópico ideal: fluídos e homogêneos.

3.4. Estudos de pré-formulação do CLN

Os grupos foram submetidos à avaliação do espalhamento de luz dinâmico para determinação da distribuição e do tamanho das partículas. O PZ foi avaliado através da mobilidade eletroforética associada à equação de Henry. Os resultados estão descritos na **tabela 4**.

Tabela 4. Resultados obtidos em relação ao tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta para as 5 formulações teste.

Formulações	D (nm)	PDI	PZ
Formulação 1	202.7 ± 52.3	0.184 ± 0.1	-11.8 ± 4.3
Formulação 2	224.2 ± 43.2	0.14 ± 0.1	-17.9 ± 5
Formulação 3	265.6 ± 90	0.29 ± 0.05	-13.4 ± 4.7
Formulação 4	238.4 ± 34.2	0.094 ± 0.03	-19.4 ± 3.2
Formulação 5	441.5 ± 67.3	0.484 ± 0.05	-13.8 ± 3.7

D: Diâmetro médio das partículas; **PDI:** Índice de Polidispersão; **PZ:** Potencial Zeta.

Ao comparar o grupo 2 (300mg de MCT) com o grupo 1 (100 mg de MCT), a quantidade de MCT pareceu contribuir com um PDI menor e PZ maior, que indicam uma maior homogeneidade e estabilidade das moléculas. No entanto, também demonstrou um pequeno aumento no tamanho das partículas. Comparando o grupo 3 com o grupo 4, que além de diferirem na quantidade de MCT, também diferiram na quantidade do Precirol, pode-se observar que uma maior quantidade dos dois (Grupo 4/ 150 mg de precirol e 200 mg de MCT) corroborou com a diminuição do tamanho das partículas, do PDI e aumento do potencial zeta. A maior quantidade de Tween observada no grupo 5 (50 mg) pareceu interferir negativamente no tamanho das partículas, na homogeneidade e no PDI da formulação.

3.5. Desenvolvimento das formulações de CLN com óleo essencial da Camomila e Clorexidina

O estudo de pré-formulação indicou que as melhores concentrações dos componentes das formulações seriam: 100mg/ml dos ativos ou MCT (grupo controle) e 75mg/ml de Precirol® ATO5, 15 mg/ml de Tween 80® e 25 mg/ml de cremophor. A **tabela 5** descreve a concentração do lipídio líquido (MCT) e sólido (precirol), tensoativo (Tween 80®) e fármacos utilizadas na confecção das formulações de CLN.

tabela 5. Concentrações dos componentes para as formulações de CLN com óleo essencial de Camomila e Clorexidina.

FORMULAÇÕES	PRECIROL	CREMOPHOR	MCT	TWEEN 80	CLOREXIDINA	CAMOMILA
FOC	75mg/ml	25mg/ml	100mg/ml	15mg/ml		
CX 100	75mg/ml	25mg/ml	-	15mg/ml	100mg/ml	
CXCM 50/50	75mg/ml	25mg/ml	-	15mg/ml	50mg/ml	50mg/ml
CM 100	75mg/ml	25mg/ml	-	15mg/ml		100mg/ml

CX 100: Formulação com 100 mg/ml de clorexidina; **CXCM 50/50:** Formulação com 50 mg/ml de clorexidina e 50 mg/ml de camomila; **CM 100:** Formulação com 100 mg/ml de camomila; **FOC:** Formulação controle; **MCT:** Lipídios de Cadeia Média.

As formulações desenvolvidas seguindo a metodologia proposta de emulsificação a quente seguida de sonicação ultrassônica, demonstraram aspecto macroscópico ideal, como leitosas e homogêneas.

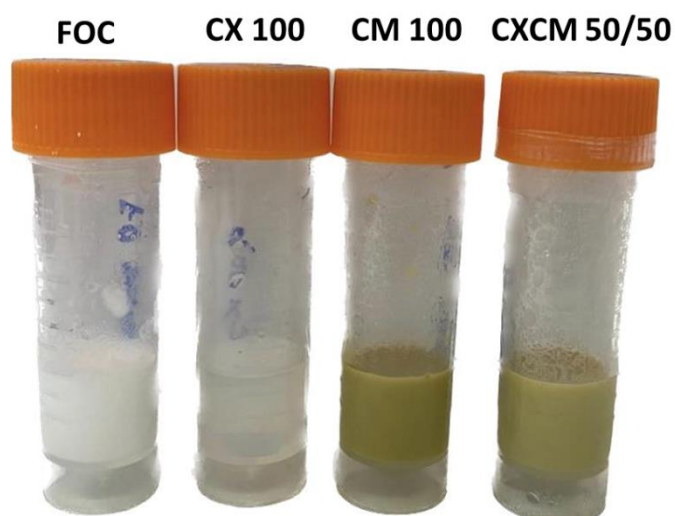


Figura 4. Aspecto macroscópico das formulações.

FOC: Formulação controle; **CX 100:** Formulação com 100 mg/ml de clorexidina; **CM 100:** Formulação com 100 mg/ml de camomila; **CXCM 50/50:** Formulação com 50 mg/ml de clorexidina e 50 mg/ml de camomila.

3.6. Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta dos CLN carregados com óleo essencial de *C.recutita* e Clorexidina

As soluções foram submetidas ao método do espalhamento de luz dinâmico (DLS) para determinação do D e o PDI das partículas. Para o PZ, o mesmo foi avaliado através da mobilidade eletroforética associada à equação de Henry. Os resultados estão listados na **tabela 6**.

Tabela 6. Resultado de análise no DLS das formulações otimizadas em relação ao D, PDI e PZ.

FORMULAÇÕES	D	PDI	PZ
CX 100	86.88 ± 44	0.223 ± 3.6	+11.5 ± 0.6
CXCM 50/50	257.8 ± 39	0.207 ± 4.6	+12.7 ± 1.6
CM 100	242.9 ± 83	0.511 ± 7.3	-4.97 ± 0.4
FC	208.9 ± 32	0.166 ± 6	-12.3 ± 0.6

D: Diâmetro médio das partículas; **PDI:** Índice de Polidispersão; **PZ:** Potencial Zeta; **CX 100:** Formulação com 100 mg/ml de clorexidina; **CXCM 50/50:** Formulação com 50 mg/ml de clorexidina e 50 mg/ml de camomila; **CM 100:** Formulação com 100 mg/ml de camomila; **FC:** Formulação controle.

Percebe-se que a adição de camomila nas formulações corroborou com um maior tamanho das partículas e índice de polidispersão. Já a Clorexidina agiu de forma contrária, visto que em sua maior concentração houve uma diminuição do tamanho das partículas e do índice de polidispersão. Na formulação com os dois ativos o D das partículas e o PDI se encontraram em equilíbrio, com bons valores. Já em relação ao PZ, a adição da Clorexidina o deixou catiônico, provavelmente em decorrência dos seus domínios polares, o que pode favorecer o uso dessa formulação também em mucosa, visto que o caráter catiônico pode prover a mucoadesão.

3.7. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Na **Figura 5a**, observa-se os espectros dos compostos isolados presentes nos CLN. Em relação ao óleo de *Chamomilla recutita*, as bandas no intervalo $\sim 1210\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ são atribuídos ao α -bisabolol, já que os álcoois terciários têm um estiramento C–O diagnóstico em $1210\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ e estiramento C–C–C em $\sim 900\text{ cm}^{-1}$. As bandas na região $\sim 1280\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas aos trechos C=C dos alcenos (farneseno). O pico em 1740 cm^{-1} é típico para vibrações C=O de terpenos e terpenóides. Uma banda larga registrada na faixa de $3600\text{ a }3000\text{ cm}^{-1}$ corresponde a grupos –OH de fenóis e álcoois. Dois picos em 2850 cm^{-1} e 2920 cm^{-1} foram atribuídos a vibrações de estiramento de grupos alifáticos simétricos e assimétricos [20–22].

Ao se analisar o espectro da clorexidina, observou-se uma banda larga na região entre $3700\text{ e }2800\text{ cm}^{-1}$, que se referiu às vibrações de estiramento de grupos aminos (N-H) presentes na estrutura da mesma, assim como da sobreposição da banda referente ao grupo hidroxila (O-H) referente à água, por estar em solução aquosa. Vibrações de C=C dos anéis aromáticos e de C-H que compõe a clorexidina também se apresentaram no espectro da mesma, porém apareceram sobrepostas nesta mesma região. Na região compreendida entre $1630\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ pôde-se observar uma pequena banda correspondente à deformação angular simétrica do plano como também dobramentos dos grupos aminos e hidroxilas. Na região entre $1485\text{ e }1445\text{ cm}^{-1}$ apareceram as bandas referentes à deformação de grupos CH_2 .

Entre 1100 e 1000 cm^{-1} observa-se um pequeno pico referente à vibração Ar-Cl (cloro ligado ao anel aromático) [23].

O espectro referente ao Tween-80 têm picos característicos em 2845 cm^{-1} (estiramento CH_2), 2920 cm^{-1} (estiramento CH_3), 1098 cm^{-1} (estiramento C–O–C) e uma banda mais larga em 3360 cm^{-1} devido a grupos OH, além de bandas de absorção devido ao estiramento de C=O em 1732 cm^{-1} [24].

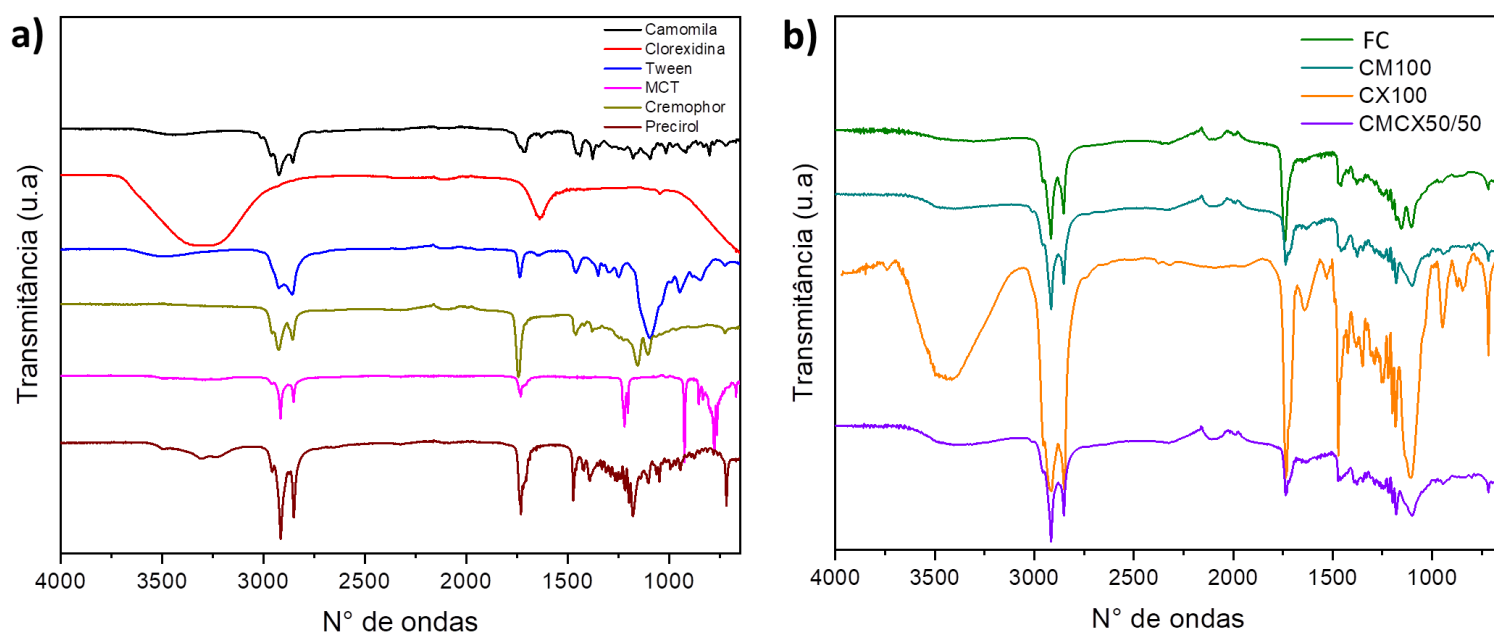
Para o MCT foram observadas uma banda em 2926 cm^{-1} atribuída ao estiramento CH e a banda de absorção muito pequena entre 1715–1730 cm^{-1} característica do estiramento C=O para ésteres, bandas entre 1.470 - 1.430 cm^{-1} atribuída ao estiramento CH_2 , bandas entre 1.200 - 1.050 atribuídas a C-O de álcoois e banda entre 730 - 675 que podem ser referentes a $-\text{CH}=\text{CH}-$ C-H fora do plano [25].

Para o Cremophor EL foram registradas uma banda larga em 3436 cm^{-1} para o grupo –OH, banda em 2926 cm^{-1} atribuída ao estiramento CH e a banda de absorção pequena entre 1715–1730 cm^{-1} característica do estiramento C=O para ésteres, semelhante aos dados relatados na literatura [26].

O precirol exibiu bandas de absorção em 1106–1300 cm^{-1} (estiramento C-O-C), 1739 cm^{-1} (estiramento C-N), 2800–3000 cm^{-1} (estiramento CH_3 livre) e 3200–3466 cm^{-1} (estiramento C=O e N-H) [27,28].

Ao se observar os espectros das formulações na **Figura 5b**, observa-se similaridade entre os mesmos com as bandas características do precirol (lipídio sólido presente na composição do CLN) em 1106–1300 cm^{-1} (estiramento C-O-C), 1739 cm^{-1} (estiramento C-N), 2800–3000 cm^{-1} (estiramento CH_3 livre), e do Tween 80 (tensoativo presente na superfície do CLN) em 1098 cm^{-1} (estiramento C–O–C). As diferenças observados entre a formulação controle (FC) e as formulações com os ativos (CM 100 e CXCM 50/50) são o maior alongamento na banda observada em 1739 cm^{-1} na formulação FC e estreitamento na banda 1106–1300 cm^{-1} nas formulações com os ativos, indicando que é possível uma interação química entre os mesmos e o precirol. A formulação CX 100 apresenta a banda entre 3700 e 2800 cm^{-1} e a banda entre 630–1650 cm^{-1} , referentes a clorexidina, ambos relacionados a grupos aminos, compostos polares e catiônicos que pela maior quantidade nessa formulação podem também ter reticulado a superfície dessas partículas de forma mais forte e sensível ao espectro do infravermelho.

Contudo, a similaridade entre os espectros da formulação controle (FC), CM 100 e da formulação de interesse CXCM 50/50 e a supressão dos picos



característicos dos ativos indica a encapsulação dos mesmos.

Figura 5. a) Espectros de FTIR dos componentes das formulações (Camomila, Clorexidina, Tween 80®, MCT, Cremophor e Precirol®); b) Espectros das formulações (FC, CM 100, CX 100 e CXCM 50/50).

3.8. Concentração inibitória mínima (CIM) dos CLN e dos ativos livres contra cepas de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Os resultados da CIM para as formulações de CLN estão descritos na **tabela 7**. A atividade antimicrobiana dos CLN foi avaliada pelo método de microdiluição. A formulação FC (formulação sem os ativos) não apresentou atividade antimicrobiana. As formulações com os ativos inibiram o crescimento microbiano frente as cepas avaliadas a partir da concentração de 0,02 µg/mL para a clorexidina e 8 µg/mL para o óleo essencial de Camomila. Observou-se que ambos os ativos quando encapsulados, demonstraram uma melhor atividade antimicrobiana. Notou-se, que para *S. aureus*, *C. albicans* e *E. coli* a formulação com os dois fármacos encapsulados apresentou melhor atividade quando comparada a Clorexidina isolada.

Tabela 7. Concentração Inibitória Mínima (CIM) das as formulações de CLN frente as cepas de *C.albicans*, *S.aureus* e *E.coli*.

Formulações	<i>C.albicans</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
CX 100	0,02 µg/ml	0,02 µg/ml	0,3 µg/ml
CXCM 50/50	0,02 µg/ml (CX) 6 µg/ml (CM)	0,04 µg/ml (CX) 20 µg/ml (CM)	0,7 µg/ml (CX) 40 µg/ml (CM)
CM 100	1560 µg/ml	6250 µg/ml	AS
CAMOMILA	SA	SA	SA
CLOREXIDINA	0,05 µg/ml	0,05 µg/ml	0,8 µg/ml
FC	SA	SA	SA

SA: Sem Atividade; **CX:** Clorexidina; **CM:** Camomila; **CX 100:** Formulação com 100 mg/ml de clorexidina; **CXCM 50/50:** Formulação com 50 mg/ml de clorexidina e 50 mg/ml de camomila; **CM 100:** Formulação com 100 mg/ml de camomila; **FC:** Formulação controle.

3.9. Avaliação do efeito de associação do óleo essencial da Camomila e Clorexidina

Os ICIF variaram de 1 a 2,3 (**Tabela 8**). Observou-se que não houve antagonismo na associação, logo, o uso combinado dessas substâncias não demonstra prejuízo em suas atividades antimicrobianas.

Tabela 8. Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) derivado da combinação: Camomila+Clorexidina.

Formulação	Combinação	<i>C. albicans</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
CXCM 50/50	Camomila+ Clorexidina	1 (indiferente)	2 (indiferente)	2,3 (indiferente)

Nota: Sinergismo: ICIF $\leq$ 0,5; Indiferente: $0,5 < \text{ICIF} \leq 4$; Antagonismo: > 4 .

ICIF: Índice da Concentração Inibitória Fracionada; **CXCM 50/50:** formulação contendo 50mg/ml do óleo de Camomila e 50mg/ml de Clorexidina.

4. DISCUSSÃO

Segundo Gad, El-Rahman e Hamdy et. al. (2019)[8] o papel essencial das nanopartículas lipídicas sólidas está em melhorar a penetração do óleo de camomila

através da barreira biológica e, portanto, acelerar a taxa de atividade de cicatrização de feridas. Isso foi confirmado por seu efeito de aumento na contração da área da ferida, aumento do grau de reepitelização, aumento da deposição de colágeno, arquitetura da pele, aumento da resistência à tração, aumento dos níveis de TGF- β e diminuição dos níveis de IL-1 β e atividade de MMP-9.

É demonstrada semelhança no observado na análise do óleo de Camomila por CG-EM com o que é relatado pela literatura, sendo o α -bisabolol o composto predominante e outros sesquiterpenos, como por exemplo o farneseno e spathulenol como compostos menores[29,30]. Foi observado a ação desses compostos na redução da formação de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos, o que nos mostra uma ação antioxidante da Camomila[7]. Rocha et al. (2011)[31], relataram que o (-) - α -bisabolol conseguiu reduzir a migração dos leucócitos em um processo inflamatório, extravasamento de proteínas e a quantidade de TNF- α (Fator de Necrose tumoral α) e redução da degranulação de neutrófilos.

Em relação a análise *in silico* por meio do *docking* molecular, foram encontrados relatos com resultados semelhantes com afinidade desse composto para os alvos avaliados (mediadores pró-cicatrizantes e inflamatórios). A literatura confirma a relevância da afinidade desse composto com alvos como o TGF- β , que promove angiogênese, migração de queratinócitos e contração da ferida, além disso, desempenha um papel fundamental na fibrose, regulando positivamente a formação da matriz extracelular (principalmente induzindo a produção de colágeno por fibroblastos), bem como as citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), que governam as atividades das células imunes durante a regeneração e afetam os queratinócitos e fibroblastos. As citocinas inflamatórias podem ser cruciais nas fases iniciais da cicatrização de feridas porque promovem o recrutamento de leucócitos [32–35].

Também foi observado no presente estudo um aumento no tamanho das partículas com o aumento da concentração do óleo da Camomila. Esse resultado é sustentado por Alexander et al. (2012)[36], que verificaram que a adição de uma droga hidrofóbica gerou um aumento no núcleo das nanopartículas, logo a formação de partículas maiores deve estar relacionada à concentração da droga hidrofóbica utilizada, o que pode impactar diretamente no tamanho do núcleo do CLN. No entanto, mesmo com o acréscimo no tamanho das partículas com a incorporação do

óleo de camomila, os CLN desenvolvidos apresentaram partículas menores (242.9 ± 83) quando comparadas as desenvolvidas por Gad, El-Rahman e Hamdy (2019) ($542,1 \pm 27,51$)[8].

Os CLN com a Clorexidina (CX 100 e CXCM 50/50) apresentaram potencial zeta catiônico ($+11.5 \pm 0.6$ e $+12.7 \pm 1.6$). Esse fato é relevante visto que o estudo de Luo et al. (2011) [37], os autores relatam que um dos principais mecanismos de mucoadesão se dá devido a presença da carga superficial positiva das partículas que irão se atrair eletrostaticamente as moléculas de carga negativa de mucosas. Os mesmos relataram que o potencial zeta catiônico conferiu mucoadesividade e capacidade de abertura transitória das junções intercelulares epiteliais em decorrência do potencial elétrico de superfície positivo de suas nanopartículas, o que também pode corroborar com o aumento na penetração dessas nanopartículas no tecido alvo e conferindo aplicabilidade também em mucosas.

O resultado do FTIR comprova a encapsulação dos ativos e demonstra no espectro da formulação CX100 que seus compostos polares podem ter reticulado as partículas e anulado a anionicidade do Tween 80. Na formulação CMCX 100 a carga superficial continua positiva, porém, as bandas referentes aos grupamentos amins da clorexidina não estão visíveis, talvez devido a menor quantidade desse ativo incluído e consequentemente menor intensidade e capacidade de absorver o espectro infravermelho [38].

Neste estudo, os ativos encapsulados em CLN exibiram atividade antibacteriana superior em comparação aos ativos não encapsulados, com valores mais baixos para concentração inibitória mínima e concentrações bactericida e fungicida mínimas. Esse comportamento pode ser decorrente da liberação controlada do fármaco proporcionada pelo encapsulamento, que protege o princípio ativo de reações químicas e aumenta a biodisponibilidade por meio da formação de uma barreira funcional que auxilia na manutenção das propriedades físico-químicas, aumentando assim a biodisponibilidade e potencializando suas funcionalidades terapêuticas [39,40].

Neste contexto, o processo de encapsulamento permite um acréscimo na proporção dos compostos antimicrobianos presentes na composição dos ativos. Esses poderiam ser facilmente perdidos caso não estivessem protegidos devido a fatores como fotossensibilidade, oxidação ou hidrólise, além de ocasionar um

aumento na capacidade de penetração desses compostos por aprisioná-los em partículas de diâmetros nanométricos. Isso pode permitir uma melhor penetração e direcionamento de fármacos na pele e mucosas, ou até mesmo em subestruturas, como as células microbianas [13,40,41].

Ng et al. (2013) [42] também relatam que o encapsulamento dos ativos pode aumentar a permeabilidade da membrana celular microbiana, bem como, produzir poros em sua estrutura, facilitando assim a penetração dos compostos. Isso resultou na morte dos microrganismos em concentrações significativamente abaixo das concentrações bactericidas/fungicidas mínimas dos ativos não encapsulados. Os resultados da presente pesquisa com concentrações inibitórias mínimas inferiores observadas nas formulações com a Clorexidina e óleo essencial de camomila encapsulados são corroborados com os estudos de Campos et al. (2020) [43]; Kubo et al. (2018) [9]; Ocsoy et al. (2017) [44] e Dogru et al. (2017) [44].

5. CONCLUSÃO

Com esse trabalho conclui-se que foi possível o desenvolvimento de um novo sistema para o encapsulamento do óleo essencial e da Clorexidina com partículas dentro da escala nanométrica e atividade antimicrobiana *in vitro* potencializada. Esses resultados são promissores visando o manejo de queimaduras e prevenção de infecções secundárias. Contudo, testes de citotoxicidade, avaliação da estabilidade dessas formulações em um veículo e sua aplicação em modelo *in vivo*, ainda precisam ser realizados para posterior aplicação clínica.

Referências

- [1] World Health Organization (WHO). Burns fact sheet 2018.
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/burns> (accessed February 5, 2023).
- [2] Pinto ACS, Costa KLN, Almeida Filho PP de, Oliveira Júnior JL de, Rocha MN dos S. Avaliação do perfil epidemiológico de pacientes adultos queimados internados em um centro de referência no interior do estado da Bahia, Brasil.

- Rev Bras Cir Plástica 2022;37:66–70.
- [3] Montes SF, Barbosa MH, Sousa Neto AL de. Aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes queimados internados em um Hospital de Ensino. Rev Da Esc Enferm Da USP 2011;45:369–73.
- [4] Rocha C de LJ V. Histofisiologia e classificação das queimaduras: consequências locais e sistêmicas das perdas teciduais em pacientes queimados. Rev Interdiscip Estud Exp Anim Hum(Impr) 2009:140–7.
- [5] Fernandes FMF de A, Torquato IMB, Dantas MS de A, Pontes Júnior F de AC, Ferreira J de A, Collet N. Queimaduras em crianças e adolescentes: caracterização clínica e epidemiológica. Rev Gaúcha Enferm 2012;33:133–41.
- [6] Maximino FL, Barbosa LMZ, Andrade MS, Camilo SB, Furlan MR. Avaliação da descontaminação fúngica de camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] por meio de diferentes métodos caseiros em duas temperaturas. Rev Bras Plantas Med 2011;13:396–400.
- [7] de OLIVEIRA FILHO AA. Matricaria chamomilla L: propriedades farmacológicas n.d.
- [8] Gad HA, Abd El-Rahman FAA, Hamdy GM. Chamomile oil loaded solid lipid nanoparticles: A naturally formulated remedy to enhance the wound healing. J Drug Deliv Sci Technol 2019;50:329–38.
- [9] Miranda GP, Vieira APM, Arias LS, Souza Neto FN, Kubo AM, Camargo ER, et al. Efeito antifúngico de um nanosistema composto por nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, quitosana e clorexidina. Arch Heal Investig 2018;7.
- [10] Bambace AMJ, de Almeida Barros ÉJ, dos Santos SSF, Jorge AOC. Eficácia de soluções aquosas de clorexidina para desinfecção de superfícies. Rev Biociências 2003;9.
- [11] Dora CL, Putaux J-L, Pignot-Paintrand I, Dubreuil F, Soldi V, Borsali R, et al. Physicochemical and morphological characterizations of glyceryl tristearate/castor oil nanocarriers prepared by the solvent diffusion method. J Braz Chem Soc 2012;23:1972–81.
- [12] Cola DF, Pasquoto T, Guilger M, Lima R de, Silva CMG da, Fraceto LF. Sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados para ivermectina e metopreno visando controle de parasitas. Quim Nova 2016;39:1034–43.

- [13] Müller RH, Petersen RD, Hommoss A, Pardeike J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:522–30.
- [14] Rivas da Silva AC, Lopes PM, Barros de Azevedo MM, Costa DC, Alviano CS, Alviano DS. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules* 2012;17:6305–16.
- [15] Varenne F, Botton J, Merlet C, Hillaireau H, Legrand F-X, Barratt G, et al. Size of monodispersed nanomaterials evaluated by dynamic light scattering: Protocol validated for measurements of 60 and 203 nm diameter nanomaterials is now extended to 100 and 400 nm. *Int J Pharm* 2016;515:245–53.
- [16] CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 2 ed. 2002.
- [17] CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard. 5 ed. 2012.
- [18] Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:1.
- [19] Shin S. Anti-Aspergillus activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin B. *Arch Pharm Res* 2003;26:389–93.
- [20] Taraj K, Malollari I, Andoni A, Ciko L, Lazo P, Ylli F, et al. Eco-extraction of albanian chamomile essential oils by liquid CO₂ at different temperatures and characterisation by FTIR spectroscopy. *J Environ Prot Ecol* 2017;18:117–24.
- [21] Andoni A, Salihila J, Ylli F, Osmëni A, Taraj K, Çomo A. Extraction of essential oil from Albanian chamomile plant by water distillation method and its characterization by FTIR spectroscopy. *Int J Ecosys Ecol Sci* 2015:321–4.
- [22] Masłowski M, Aleksieiev A, Miedzianowska J, Strzelec K. Potential application of peppermint (*Mentha piperita* L.), german chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) and yarrow (*Achillea millefolium* L.) as active fillers in natural rubber biocomposites. *Int J Mol Sci* 2021;22:7530.
- [23] Dos Santos MVB, Feitosa GT, Osajima JA, Santos RLP, da Silva EC. Development of a biomaterial made by hydroxyapatite and chlorhexidine for application to the oral cavity. *Cerâmica* 2019;65:130–8.
- [24] Khan Y, Durrani SK, Siddique M, Mehmood M. Hydrothermal synthesis of alpha Fe₂O₃ nanoparticles capped by Tween-80. *Mater Lett* 2011;65:2224–7.
- [25] Tan K-X, Ng L-LE, Loo SCJ. Formulation Development of a Food-Graded

- Curcumin-Loaded Medium Chain Triglycerides-Encapsulated Kappa Carrageenan (CUR-MCT-KC) Gel Bead Based Oral Delivery Formulation. *Materials* (Basel) 2021;14:2783.
- [26] Tănase MA, Raducan A, Oancea P, Dițu LM, Stan M, Petcu C, et al. Mixed pluronic—Cremophor polymeric micelles as nanocarriers for poorly soluble antibiotics—The influence on the antibacterial activity. *Pharmaceutics* 2021;13:435.
- [27] Sabzichi M, Mohammadian J, Ghorbani M, Saghaei S, Chavoshi H, Ramezani F, et al. Fabrication of all-trans-retinoic acid-loaded biocompatible precirol: A strategy for escaping dose-dependent side effects of doxorubicin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2017;159:620–8.
- [28] Pezeshki A, Ghanbarzadeh B, Mohammadi M, Fathollahi I, Hamishehkar H. Encapsulation of vitamin A palmitate in nanostructured lipid carrier (NLC)-effect of surfactant concentration on the formulation properties. *Adv Pharm Bull* 2014;4:563.
- [29] Ling C, Zheng L, Yu X, Wang H, Wang C, Wu H, et al. Cloning and functional analysis of three aphid alarm pheromone genes from German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Plant Sci* 2020;294:110463.
- [30] Agatonovic-Kustrin S, Ortakand DB, Morton DW, Yusof AP. Rapid evaluation and comparison of natural products and antioxidant activity in calendula, feverfew, and German chamomile extracts. *J Chromatogr A* 2015;1385:103–10.
- [31] Rocha NFM, Rios ERV, Carvalho AMR, Cerqueira GS, Lopes A de A, Leal LKAM, et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (–)- α -bisabolol in rodents. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2011;384:525–33.
- [32] Teixeira GFD, Vieira-Neto AE, da Costa FN, e Silva ARA, Campos AR. Antinociceptive effect of (–)- α -bisabolol in nanocapsules. *Biomed Pharmacother* 2017;91:946–50.
- [33] Ortiz MI, Fernández-Martínez E, Soria-Jasso LE, Lucas-Gómez I, Villagómez-Ibarra R, González-García MP, et al. Isolation, identification and molecular docking as cyclooxygenase (COX) inhibitors of the main constituents of *Matricaria chamomilla* L. extract and its synergistic interaction with diclofenac on nociception and gastric damage in rats. *Biomed Pharmacother*

- 2016;78:248–56.
- [34] K Maurya A, Singh M, Dubey V, Srivastava S, Luqman S, U Bawankule D. α -(-)-bisabolol reduces pro-inflammatory cytokine production and ameliorates skin inflammation. *Curr Pharm Biotechnol* 2014;15:173–81.
 - [35] Ahmed SR, Mostafa EM, Musa A, Rateb EE, Al-Sanea MM, Abu-Baih DH, et al. Wound Healing and Antioxidant Properties of *Launaea procumbens* Supported by Metabolomic Profiling and Molecular Docking. *Antioxidants* 2022;11:2258.
 - [36] Alexander S, Cosgrove T, Castle TC, Grillo I, Prescott SW. Effect of temperature, cosolvent, and added drug on pluronic–flurbiprofen micellization. *J Phys Chem B* 2012;116:11545–51.
 - [37] Luo Y, Zhang B, Whent M, Yu LL, Wang Q. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2011;85:145–52.
 - [38] Priyadarshini BM, Selvan ST, Lu TB, Xie H, Neo J, Fawzy AS. Chlorhexidine nanocapsule drug delivery approach to the resin-dentin interface. *J Dent Res* 2016;95:1065–72.
 - [39] Bakry AM, Abbas S, Ali B, Majeed H, Abouelwafa MY, Mousa A, et al. Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2016;15:143–82.
 - [40] Esmaeili A, Asgari A. In vitro release and biological activities of *Carum copticum* essential oil (CEO) loaded chitosan nanoparticles. *Int J Biol Macromol* 2015;81:283–90.
 - [41] Katopodi A, Detsi A. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers of natural products as promising systems for their bioactivity enhancement: The case of essential oils and flavonoids. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2021;630:127529.
 - [42] Ng VWL, Ke X, Lee ALZ, Hedrick JL, Yang YY. Synergistic co-delivery of membrane-disrupting polymers with commercial antibiotics against highly opportunistic bacteria. *Adv Mater* 2013;25:6730–6.
 - [43] Campos LMP, Boaro LCC, Santos TMR, Varca GHC, SANTOS LKG, LUGAO AB, et al. Estudo da liberação de clorexidina incorporada em nanopartículas de montmorilonita em compósitos a base de BisGMA/TEGDMA. *Braz Oral Res*

2020.

- [44] Dogru E, Demirbas A, Altinsoy B, Duman F, Ocsoy I. Formation of *Matricaria chamomilla* extract-incorporated Ag nanoparticles and size-dependent enhanced antimicrobial property. *J Photochem Photobiol B Biol* 2017;174:78–83.