



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

JHONATAN CLISMAN DO NASCIMENTO DOS ANJOS

AVALIAÇÃO *In vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL
DAS FOLHAS DE *Ayapana triplinervis* E DE SEU SISTEMA
NANOEMULSIONADO

Macapá
2023

JHONATAN CLISMAN DO NASCIMENTO DOS ANJOS

**AVALIAÇÃO *In vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL
DAS FOLHAS DE *Ayapana triplinervis* E DE SEU SISTEMA
NANOEMULSIONADO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof^o. Dr. Fabio Rodrigues de Oliveira

Co-orientador: Prof^o. Dr. Alex Bruno Lobato Rodrigues

Macapá
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central/UNIFAP-Macapá-AP
Elaborado por Mário das Graças Carvalho Lima Júnior – CRB-2 / 1451

A599 Anjos, Jhonatan Clisman do Nascimento dos.

Avaliação In vitro da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de Ayapana triplinervis e de seu sistema nanoemulsionado / Jhonatan Clisman do Nascimento dos Anjos. - Macapá, 2023.

1 recurso eletrônico. 44 folhas.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Curso de Farmácia, Macapá, 2023.

Orientador: Fabio Rodrigues de Oliveira.

Modo de acesso: World Wide Web.

Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).

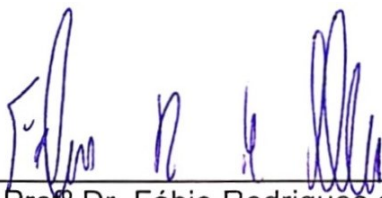
1. Farmácia - Óleo essencial. 2. Nanoemulsões. 3. Ayapana triplinervis. I. Oliveira, Fabio Rodrigues de, orientador. II. Universidade Federal do Amapá. III. Título.

CDD 23. ed. – 615

JHONATAN CLISMAN DO NASCIMENTO DOS ANJOS

**AVALIAÇÃO *In vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL
DAS FOLHAS DE *Ayapana triplinervis* E DE SEU SISTEMA
NANOEMULSIONADO**

Data de Aprovação: 17 / 04 / 2023



Orientador: Prof^o Dr. Fábio Rodrigues de Oliveira - UNIFAP



Co-orientador: Prof^o Dr. Alex Bruno Lobato Rodrigues - UNIFAP



Avaliador (a): Prof^a Dra. Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira - UNIFAP



Avaliador (a): Prof^a Dra. Sílvia Maria Mathes Faustino - UNIFAP

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sabedoria, força e inspiração concedidas ao longo dessa jornada. Sua presença em minha vida foi uma fonte de conforto e motivação durante todo o processo.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram. Em especial, quero agradecer aos meus orientadores Fábio Oliveira e Alex Rodrigues, pelo valioso apoio, orientação, suporte e dedicação. Seu conhecimento, experiência e feedbacks foram fundamentais para o aprimoramento deste trabalho.

Agradeço também aos professores e demais membros do corpo docente do curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, pela oportunidade de aprendizado e pelo compartilhamento de conhecimentos ao longo da minha jornada acadêmica.

Quero expressar minha gratidão a Thiago de Oliveira, suas palavras encorajadoras e atitudes amorosas me inspiraram a nunca desistir e acreditar em meu potencial. Minha avó Zilda, que sempre acreditou em meus sonhos. Sua confiança em mim e seu constante apoio foram fundamentais para eu perseverar e buscar meus objetivos. Não posso esquecer de mencionar meus familiares, que também desempenharam um papel crucial em minha jornada. Seu incentivo contínuo, apoio emocional e compreensão foram pilares essenciais para me manter motivado e focado em meio aos desafios que enfrentei.

Ao Calfeu Mourão pela inestimável colaboração nos experimentos necessários para a realização deste trabalho.

Por fim, sou grato aos amigos mais que especiais Annita Neri, Ana Clara Pantoja, Bruna Flexa, Caio Arrelias, Ericlison Willian, Harlena Santos e a todos os demais colegas de curso que contribuíram de alguma forma, e por fazerem parte desta jornada acadêmica.

Muito obrigado!

RESUMO

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário da planta e conhecidos por suas propriedades antimicrobianas, mas sofrem com as desvantagens de serem voláteis e de difícil incorporação em soluções aquosas devido à sua natureza lipofílica. As nanoemulsões consistem em gotículas de tamanho nanométrico estabilizadas por emulsificantes, e apesar de termodinamicamente instáveis são mais permeáveis devido aos seus menores tamanhos de partícula e maior área superficial, o que pode contornar as desvantagens do óleo essencial e melhorar seus efeitos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antibacteriana do óleo essencial das folhas e nanoemulsão da espécie *Ayapana triplinervis*. As nanoemulsões com óleo essencial foram preparadas por um método de baixo aporte de energia, e sua caracterização físico-química, bem como a distribuição do tamanho das partículas foram avaliadas por eletroforética por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) e carga superficial (potencial zeta). A atividade antibacteriana foi avaliada usando o método de microdiluição em cepas de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas usando ensaios com resazurina. A nanoemulsão do óleo essencial do morfotipo A apresentou tamanho de partícula de $175,37 \pm 3,60$ nm (índice de polidispersividade $0,369 \pm 0,046$ e potencial zeta igual $-45,7 \pm 4,68$ mV), e a nanoemulsão do óleo essencial do morfotipo B apresentou tamanho de partícula de $162,20 \pm 0,66$ nm (índice de polidispersividade igual a $0,377 \pm 0,025$ e potencial zeta de $-42,7 \pm 5,08$ mV). Os resultados indicaram que o óleo essencial e o sistema nanoemulsionado de *Ayapana triplinervis* não apresentaram potencial antimicrobiano nas concentrações testadas.

Palavras-Chave: Ação antibacteriana. Óleo essencial. Nanoemulsões. *Ayapana triplinervis*

ABSTRACT

Essential oils are products of secondary plant metabolism and known for their antimicrobial properties, but suffer from the disadvantages of being volatile and difficult to incorporate into aqueous solutions due to their lipophilic nature. Nanoemulsions consist of nano-sized droplets stabilized by emulsifiers, and although thermodynamically unstable they are more permeable due to their smaller particle sizes and larger surface area, which can circumvent the disadvantages of the essential oil and enhance its effects. Thus, the aim of this work was to evaluate the antibacterial action of the essential oil from the leaves and nanoemulsion of *Ayapana triplinervis* species. Nanoemulsions with essential oil were prepared by a low energy input method, and their physicochemical characterization as well as particle size distribution were evaluated by photon correlation spectroscopy (PCS) and surface charge (zeta potential) electrophoretics. The antibacterial activity was evaluated using the microdilution method on Gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*) and Gram-negative (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) bacterial strains. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined using resazurin assays. The nanoemulsion of the essential oil of morphotype A showed particle size of 175.37 ± 3.60 nm (polydispersity index 0.369 ± 0.046 and zeta potential equal to -45.7 ± 4.68 mV), and the nanoemulsion of the essential oil of morphotype B showed particle size of 162.20 ± 0.66 nm (polydispersity index equal to 0.377 ± 0.025 and zeta potential of -42.7 ± 5.08 mV). The results indicated that the essential oil and nanoemulsified system of *Ayapana triplinervis* did not show antimicrobial potential at the tested concentrations.

Key-words: Antibacterial action. Essential oil. Nanoemulsions. *Ayapana triplinervis*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Tipos de <i>Ayapana triplinervis</i> : Branca (A, C e D) e Roxa (B, E e F).....	20
Figura 2 -	Principais compostos identificados no óleo essencial de <i>Ayapana triplinervis</i>	22
Figura 3 -	Nanoemulsão do morfótipo A (A) e Nanoemulsão do morfótipo B (B) em EHL 16.....	30
Figura 4 -	Distribuição de tamanho de partícula (A) e Potencial Zeta (C) da nanoemulsão do óleo essencial do morfotipo A, e Distribuição de tamanho de partícula (B) e Potencial Zeta (D) da nanoemulsão do óleo essencial do morfotipo B de <i>Ayapana triplinervis</i>	31
Figura 5 -	Resultado da avaliação antibacteriana do óleo essencial e nanoemulsão de <i>Ayapana triplinervis</i> sobre a cepa de <i>S. aureus</i>	31
Figura 6 -	Resultado do crescimento microbiano <i>S. aureus</i> (A - OE de Japana branca. B - OE de Japana roxa. C - Nanoemulsão OE de Japana branca. D - Nanoemulsão OE de Japana roxa. E - Controle negativo. F - Controle positivo).....	33
Figura 7 -	Resultado da avaliação antibacteriana do óleo essencial e nanoemulsão de <i>Ayapana triplinervis</i> sobre a cepa de <i>E. faecalis</i>	33
Figura 8 -	Resultado do crescimento microbiano <i>S. aureus</i> (A - OE de Japana branca. B - OE de Japana roxa. C - Nanoemulsão OE de Japana branca. D - Nanoemulsão OE de Japana roxa. E - Controle negativo. F - Controle positivo).....	34
Figura 9 -	Resultado da avaliação antibacteriana do óleo essencial e nanoemulsão de <i>Ayapana triplinervis</i> sobre a cepa de <i>E. coli</i>	34
Figura 10 -	Resultado do crescimento microbiano <i>S. aureus</i> (A - OE de Japana branca. B - OE de Japana roxa. C - Nanoemulsão OE de Japana branca. D - Nanoemulsão OE de Japana roxa. E - Controle negativo. F - Controle positivo).....	35

Figura 11 - Resultado da avaliação antibacteriana do óleo essencial e nanoemulsão de <i>Ayapana triplinervis</i> sobre a cepa de <i>P. aeruginosa</i>	35
Figura 12 - Resultado do crescimento microbiano <i>S. aureus</i> (A - OE de Japana branca. B - OE de Japana roxa. C - Nanoemulsão OE de Japana branca. D - Nanoemulsão OE de Japana roxa. E - Controle negativo. F - Controle positivo)	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana de compostos de óleos essenciais contra diferentes micro-organismos.....	17
Tabela 2 - Constituintes de óleo essencial <i>Ayapana triplinervis</i>	21
Tabela 3 - Uso popular da <i>Ayapana triplinervis</i> em diferentes países do mundo.....	23

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
OEs	Óleos Essenciais
EHL	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
PCS	Photon Correlation Spectroscopy (Espectroscopia de Correlação de Fótons)
nm	Nanômetro
µL	Microlitro
µg/mL	Micrograma por mililitro
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mililitros
ATCC	American Type Culture Collection

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1	PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DE PRODUTOS NATURAIS ...	14
3.1.1	Classes de metabólitos vegetais com atividade antimicrobiana	16
3.2	ÓLEOS ESSENCIAIS	16
3.3	A ESPÉCIE <i>Ayapana triplinervis</i>	19
3.4	SISTEMA NANOEMULSIONADO.....	24
3.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS NANOEMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	AQUISIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Ayapana triplinervis</i>	27
4.2	REAGENTES E MEIOS DE CULTURA	27
4.3	PREPARO DA NANOEMULSÃO	27
4.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	28
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL E DA SUA NANOEMULSÃO	28
4.6	PREPARO DO INÓCULO BACTERIANO	28
4.7	DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS A SEREM TESTADAS	29
4.8	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – CIM....	29
4.9	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA – CBM	29
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	29

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES.....	30
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>A. triplinervis</i> E SUA NANOEMULSÃO CONTRA CEPAS BACTERIANAS.....	32
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema crescente em todo o mundo, aumentando a dificuldade no tratamento de infecções e representando uma ameaça à saúde pública. Uma das alternativas para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos é a utilização de compostos naturais, como os óleos essenciais, que possuem propriedades antibacterianas e antifúngicas. A biodiversidade é uma importante fonte de compostos ativos naturais derivados de plantas, que oferecem grandes avanços na pesquisa terapêutica, e a descoberta de novas substâncias promissoras com atividades biológicas e farmacológicas, incluindo substâncias com potencial ação antibacteriana.

A espécie *Ayapana triplinervis* é uma planta nativa da América do Sul, utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades, incluindo infecções. Estudos demonstraram que os extratos das folhas de *Ayapana triplinervis* possuem atividade antimicrobiana contra algumas bactérias e fungos patogênicos.

A nanotecnologia tem sido utilizada para aumentar a eficácia dos óleos essenciais como agentes antimicrobianos, através da produção de sistemas nanoemulsionados. As nanoemulsões são sistemas coloidais constituídos por gotículas de tamanho de partícula de 20 a 200 nanômetros, em que o líquido disperso é normalmente um óleo ou um líquido orgânico e o meio dispersante é a água, conferindo melhor solubilidade e biodisponibilidade ao composto ativo, melhor penetração nas células bacterianas, maior estabilidade e menor toxicidade.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar uma nanoemulsão formulada a partir do óleo essencial das folhas de *Ayapana triplinervis*, bem como comparar a atividade antibacteriana do óleo essencial e do sistema nanoemulsionado através de estudos *in vitro* contra cepas bacterianas. Para isso, a metodologia utilizada inclui o método de microdiluição em caldo em placa de 96 poços que é a técnica utilizada para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM), e para desenvolver a nanoemulsão se utiliza do método de baixo aporte de energia por inversão de fase. Com isso, espera-se obter resultados significativos e promissores da nanoemulsão e do óleo essencial, bem como contribuir para os estudos dessa espécie vegetal. Além disso, a descoberta de novos compostos antimicrobianos é fundamental para o combate às infecções bacterianas, especialmente as multirresistentes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a ação antibacteriana do óleo essencial e de uma nanoemulsão de *Ayapana triplinervis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar uma nanoemulsão a partir dos óleos essenciais das folhas de *Ayapana triplinervis*;
- Caracterizar as nanoemulsões preparadas;
- Avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *Ayapana triplinervis* e de sua nanoemulsão contra bactérias Gram positivas e Gram negativas;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial das folhas de *Ayapana triplinervis* e de sua nanoemulsão pelo método de microdiluição em caldo em placa de 96 poços;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DE PRODUTOS NATURAIS

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2021), os agentes antimicrobianos são substâncias que possuem a capacidade de combater microrganismos, como bactérias, vírus, fungos e parasitas. Eles são utilizados no tratamento de infecções causadas por esses microrganismos. Exemplos comuns de agentes antimicrobianos incluem antibióticos e antifúngicos, que desempenham um papel na saúde pública e na proteção contra doenças infecciosas.

Os antimicrobianos podem ser classificados em bactericidas ou bacteriostáticos. Os antimicrobianos bacteriostáticos inibem a síntese proteica das bactérias, impedindo sua multiplicação, mas não as matam. Exemplos desses antimicrobianos incluem a tetraciclina, cloranfenicol e macrolídeos. Por outro lado, os antimicrobianos bactericidas destroem a parede celular das bactérias, interrompem a síntese de proteínas ou afetam o metabolismo bacteriano, levando à morte das bactérias. Exemplos desses antimicrobianos podem incluir a penicilina, cefalosporinas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Além dos diferentes tipos de agentes e efeitos, os antimicrobianos também possuem alvos específicos de ação:

- Inibição da síntese de parede celular: essa classe de antimicrobianos atua inibindo a síntese da parede celular das bactérias, levando ao enfraquecimento e a lise celular (YAO; ROCK, 2015).
- Inibição da síntese de proteínas: esse grupo de antimicrobianos atua inibindo a síntese de proteínas bacterianas, interrompendo o ciclo de vida da bactéria (ARENZ; WILSON, 2016).
- Inibição da síntese de ácido nucléico: esses antimicrobianos atuam inibindo a síntese de ácidos nucléicos, impedindo a divisão celular bacteriana (IYER *et al.*, 2003).
- Inibição da atividade enzimática: essa classe de antimicrobianos atua inibindo a atividade enzimática das bactérias, comprometendo sua sobrevivência (MOIR, 2005).

- Danos à membrana: esses antimicrobianos atuam causando danos à membrana celular das bactérias, aumentando sua permeabilidade e levando à morte celular (LI *et al.*, 2017).

A resistência antimicrobiana é um desafio significativo na utilização de antimicrobianos, sendo um problema global de saúde pública. A resistência ocorre quando os microrganismos não respondem mais aos medicamentos devido a mudanças em sua composição ao longo do tempo, tornando as infecções mais difíceis de tratar e aumentando o risco de disseminação de doenças graves e mortais. A resistência antimicrobiana torna os antibióticos e outros medicamentos antimicrobianos menos eficazes no tratamento das infecções (OMS, 2021).

Diante desse desafio, a ciência busca constantemente atualizações, desde o uso adequado de antimicrobianos até a busca por novos medicamentos com atividade antibacteriana. A descoberta e desenvolvimento de novos agentes ativos a partir da biodiversidade natural é uma abordagem importante para enfrentar esse problema, com o objetivo de suprimir parcial ou completamente os mecanismos de resistência (SILVA; NOGUEIRA, 2021).

Um estudo investigou a propriedade antimicrobiana do extrato de raiz e das folhas de *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz) contra bactérias patogênicas, incluindo *Staphylococcus aureus*. Os extratos foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano e os resultados mostraram forte atividade dos extratos, apresentando ação antimicrobiana significativa contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* apresentando concentração inibitória mínima (CIM) contra *Staphylococcus aureus* de 125 µg/mL. Os autores concluíram que os extratos de folhas de alcaçuz têm potencial como agente antimicrobiano contra bactérias patogênicas e a maioria dos seus efeitos antimicrobianos é devido aos componentes isoflavonoides, particularmente hispaglabridina e B,4'-O-metilglabridina, glabridina, glabriol e 3-hidroxi glabrol (IRANI *et al.*, 2010).

Outro estudo investigou os efeitos antimicrobianos do extrato metanólico de folhas de *Eucalyptus globulus* em bactérias patogênicas isoladas de amostras clínicas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Haemophilus influenzae*. Os valores de CIM50, CIM90 e CBM variaram de 16 a 64 mg/L, de 32 a 128 mg/L e de 64 a 512 mg/L, respectivamente, dependendo da espécie. O eucaliptol (1,8-cineol) é o ingrediente ativo do óleo de eucalipto

responsável por suas diversas atividades farmacológicas, é um monoterpene de grande índice terapêutico. (SALARI *et al.*, 2006).

3.1.1 Classes de metabólitos vegetais com atividade antimicrobiana

Nos últimos anos, devido à sua composição química e à presença de metabólitos bioativos, as plantas têm sido objeto de investigação para o desenvolvimento de novas drogas destinadas ao controle de infecções bacterianas, representando uma abordagem promissora nesse campo (JAYARAMAN *et al.*, 2010). Além disso, os compostos apresentam atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, entre outras, que podem contribuir para a prevenção e o tratamento de diversas doenças crônicas, sendo também amplamente estudados em relação ao seu potencial nutracêutico (FIGUEIREDO; CARVALHO, 2015).

Entre os principais metabólitos vegetais com atividade antimicrobiana, destacam-se os compostos fenólicos, como os flavonoides, tais como a quercetina encontrada em várias frutas e vegetais; o epigallocatequina galato encontrado no chá verde (*Camellia sinensis*) e a rutina encontrada em diversas plantas (CUSHNIE; LAMB, 2005; ARIMA; ASHIDA; DANNO, 2002; SHIOTA *et al.*, 1999). Os terpenoides, compostos derivados do isopreno, também apresentam atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de micro-organismos. Exemplos de terpenoides incluem o timol e o carvacrol, encontrados em óleos essenciais de plantas como o orégano (*Origanum vulgare*) e o tomilho (*Thymus vulgaris*). Os óleos essenciais, que são compostos voláteis encontrados em plantas, também possuem atividade antimicrobiana contra microrganismos (NASCIMENTO *et al.*, 2000; BAKKALI *et al.*, 2008).

3.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Atualmente, há um interesse em compostos naturais, e os óleos essenciais (OEs) têm sido objeto de investigação como recursos promissores e sustentáveis para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (CHOUHAN *et al.*, 2017). Os OEs são compostos lipofílicos voláteis, representados principalmente por monoterpene e sesquiterpene, com um amplo espectro de propriedades biológicas, incluindo atividades antibacterianas e antifúngicas (SEOW *et al.*, 2013). A Tabela 1 apresenta alguns compostos de OEs com atividade contra micro-organismos.

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana de compostos de óleos essenciais contra diferentes micro-organismos.

	ÓLEO ESSENCIAL	COMPOSTO PRINCIPAL	MICROORGANISMOS
Atividade Antibacteriana	Hortelã-pimenta e Óleo de menta	Mentol	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
	Óleo de limão e Canela	Linalol	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>
	Óleo de cravo	Eugenol	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Salmonella typhimurium</i>
	Óleo de Gengibre	Gingerol	<i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Porphyromonas endodontalis</i> <i>Prevotella intermedis</i>
	Óleo de Mostarda	Isotiocianato de alila (ITCA)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Salmonella enteritidis</i>
Atividade Antifúngica	Óleo de cravo		<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Chaetomium globosum</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>
	Óleo de Tea Tree		<i>Epidermophyton floccosum</i> <i>Microsporum canis</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium spp.</i> <i>Alternaria spp.</i> <i>Candida albicans</i>
	Orégano		<i>Chaetomium globosum</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Alternaria alternata</i>

Fonte: Adaptado de ALJAAFARI *et al.*, 2021

A volatilidade, baixa solubilidade em água e instabilidade na presença de calor, luz e oxigênio são fatores limitantes para diversas aplicações dos OEs. Essas características podem influenciar a durabilidade e a eficácia dos OEs, o que pode requerer formulações especiais, técnicas de encapsulamento para utilização efetiva em determinadas aplicações (TUREK; STINTZING, 2012).

A extração de OEs pode ser uma estratégia econômica para valorizar espécies de plantas pouco utilizadas ou pouco conhecidas, o que pode contribuir para a conservação de ecossistemas e a diversidade biológica. Além disso, os OEs têm sido considerados como alternativas aos conservantes sintéticos na indústria alimentícia, ajudando na redução do uso de aditivos químicos prejudiciais à saúde humana (ALONSO, 2022).

Estudos têm investigado a atividade de óleos essenciais contra patógenos, como bactérias, vírus e fungos. Por exemplo, um estudo conduzido por El Atki *et al.* (2019) investigou a atividade antibacteriana e os mecanismos de ação do óleo essencial da casca de *Cinnamomum cassia* (canela) contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados mostraram que o óleo essencial de canela foi capaz de inibir o crescimento de todas as cepas testadas, com concentração inibitória mínima (CIM) relatada de 4,88 µg/ml para *E. coli* e *S. aureus*, e 19,53 µg/ml para *P. aeruginosa*. O estudo mostrou que o óleo essencial de canela atua contra as bactérias através de múltiplos mecanismos, incluindo a inibição da síntese de proteínas e de ácidos nucleicos, além de causar danos à membrana celular e aumentar a permeabilidade da membrana apresentando forte potencial como agente antimicrobiano.

O óleo essencial de *Vernonia chalybaea* e seu principal constituinte, o β-cariofileno, também foram avaliados em relação a sua atividade antimicrobiana em diferentes espécies de fungos patogênicos. Os resultados mostraram que tanto o óleo essencial quanto o β-cariofileno apresentaram atividade antifúngica significativa, especialmente contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Além disso, o óleo essencial e o β-cariofileno demonstraram atividade antioxidante, o que sugere seu potencial uso como conservante natural em produtos alimentícios (SOBRINHO *et al.*, 2020).

De acordo com Torres-Alvarez *et al.* (2020), a baixa solubilidade dos óleos essenciais em água pode afetar sua atividade antimicrobiana, uma vez que os compostos presentes nesses óleos não conseguem penetrar facilmente na membrana celular de bactérias e fungos em meio aquoso. Como mencionado por Garcia (2013) em um estudo que avaliou a solubilidade em água de diversos óleos essenciais e sua relação com a atividade antimicrobiana, a baixa solubilidade em água dos óleos essenciais pode limitar a eficácia em certas aplicações, como em formulações à base

de água. Os autores também discutiram estratégias para melhorar a solubilidade em água dos óleos essenciais, como a utilização de surfactantes e a microemulsificação.

3.3 A ESPÉCIE *Ayapana triplinervis*

A *Ayapana triplinervis* (M. Vahl) R.M.King & H.Rob, é conhecida popularmente como japana, japana branca, japana roxa e erva-de-cobra, uma planta herbácea perene que possui ampla distribuição geográfica na América Latina. Ela é comumente encontrada em áreas de cerrado e mata atlântica no Brasil e em outros países da região, como Porto Rico, Trinidad Tobago, Peru, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Suriname e Argentina. Além disso, é possível encontrar a planta em algumas regiões da Ásia, como Índia, Vietnã, Bangladesh, Indonésia e China. *A. triplinervis* também pode ser encontrada em algumas ilhas ao leste de Madagascar, como as Ilhas Maurício e a Reunião (MORAES *et al.*, 2022).

Ayapana triplinervis, pertencente à família Asteraceae, pode ser encontrada na literatura como *Eupatorium triplinerves* e *Eupatorium ayapana*, que são sinônimas científicas. Trata-se de uma erva bastante delicada, perene, que mede cerca de 20 a 30 cm, com caule ereto semi-lenhoso na base, ferrugíneo e glabro. Suas folhas são aromáticas, simples, opostas, longas, lisas, lanceoladas, acuminadas e triplinervadas, medindo de 5 a 10 cm. As hastes possuem coloração marrom-avermelhada, enquanto a inflorescência apresenta-se em forma de capítulos brancos, com diâmetro de 6 a 12 mm e 20 a 30 flores reunidas em capítulos dispostos terminalmente. Seu fruto é do tipo aquênio, alongado, anguloso, estriado e diminuto, com papilho do mesmo tamanho (MORAES *et al.*, 2022; NERY *et al.*, 2014).

A espécie pode ser encontrada em dois morfotipos: Japana-branca (identificada como morfotipo A) e Japana-roxa (identificada como morfotipo B) (Figura 1) (NERY *et al.*, 2014).

Figura 1 - Tipos de *Ayapana triplinervis*: Branca (A, C e D) e Roxa (B, E e F)



Fonte: Adaptado de NERY *et al.* (2014)

Os estudos acerca da fitoquímica da planta *Ayapana triplinervis* determinou que grande parte dos constituintes, pertencem à classe das cumarinas e de compostos orgânicos obtidos a partir do óleo essencial. A caracterização do óleo essencial de *Ayapana triplinervis*, em todos os estudos levantados, foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massa (CG/EM) (PAIXÃO, 2016).

Pela grande variedade geográfica da espécie, muitos estudos realizados tiveram diversos compostos obtidos e diferentes resultados. A análise do óleo essencial obtido das folhas de *Ayapana triplinervis* coletada na Índia identificou os compostos majoritários selina-4(15%), 7(11)-dien-8-ona (36,6%); β -cariofileno (14,7%); δ -elemeno (5,9%); β -sesquifelandreno (4,7%) (GUPTA *et al.*, 2004).

O óleo essencial obtido das folhas e caules da espécie *Ayapana triplinervis*, colhida no estado do Amapá, no norte do Brasil, foi analisado em um estudo realizado por Maia (1999), onde foi identificado que o óleo essencial é composto principalmente por éter dimetílico timohidroquinona ou 2,5-dimetoxi-*p*-cimeno (69,7%) e β -cariofileno (19,7%). Em um estudo mais recente realizado por Rodrigues *et al.* (2021) no mesmo estado, a planta foi separada em dois morfotipos, Japana-branca (morfotipo A) e Japana-roxa (morfotipo B), e o óleo essencial extraído das folhas de ambos os

morfotipos apresentou como constituintes majoritários o éter dimetílico timohidroquinona (32,93% para o Morfotipo A e 84,53% para o morfotipo B) e β -cariofileno (45,93% para o Morfotipo A e não detectado no morfotipo B). Outros constituintes também foram identificados e podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2 - Constituintes de óleo essencial *Ayapana triplinervis*

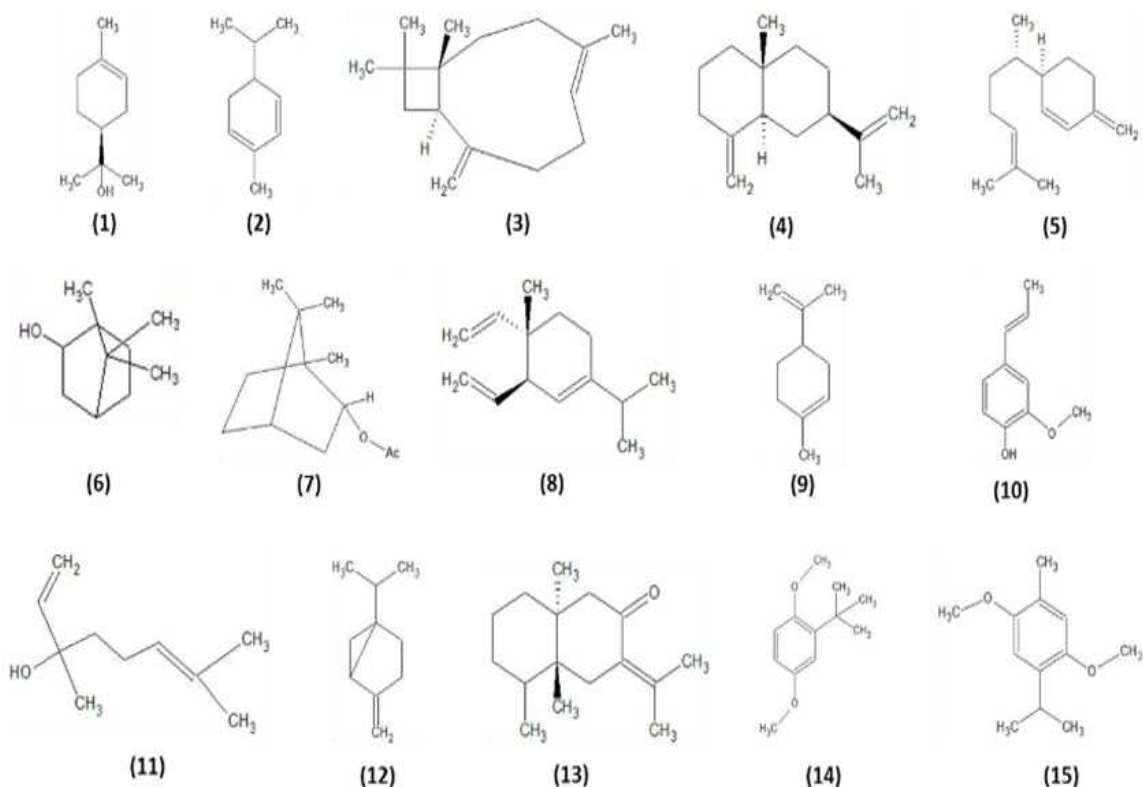
Composição	Morfotipo A	Morfotipo B
	<i>Porcentagem (%)</i>	
<i>α-Pino</i>	0.93	1.25
<i>β-Pino</i>	2.16	2.26
<i>Eter de Timol Metil</i>	0.68	-
<i>α-Gurjunene</i>	0.98	0.41
<i>β-Cariofileno</i>	45.93	-
<i>Éter Dimetílico TimoHidroquinona</i>	32.93	84.53
<i>α-Humuleno</i>	1.60	1.11
<i>Acifileno</i>	0.53	-
<i>β-Selineno</i>	0.88	0.41
<i>α-Muurolene</i>	0.45	-
<i>Valenceno</i>	-	0.53
<i>γ-Gurjunene</i>	0.64	-
<i>Óxido de Cariofileno</i>	0.76	0.67
<i>2,5-Di-Terc-Butil-1,4-Benzoquinona</i>	4.22	1.82
<i>α-Cedreno Epóxido</i>	-	0.93

Fonte: Adaptado de RODRIGUES *et al.* 2021

Gauvin-Bialecki e Marodon (2008), realizaram um estudo com o óleo essencial obtido das folhas de *A. triplinervis* coletada em diferentes estágios de desenvolvimento

em três regiões distintas na Ilha da Reunião (Réunion), território francês localizado ao leste de Madagascar. Neste estudo, 47 compostos foram identificados em três amostras de óleo essencial, sendo o derivado aromático éter dimetílico timohidroquinona, o composto predominante, totalizando 89,9–92,8%, seguido pelo hidrocarboneto sesquiterpênico β -selineno com 2,1–3,4%. Todos os compostos químicos, dos estudos químicos de *A. triplinervis* citados acima podem ser vistos na Figura 2.

Figura 2 - Principais compostos identificados no óleo essencial de *Ayapana triplinervis*. (1) α -felandreno, (2) α -terpineol, (3) β -cariofileno, (4) β -selineno, (5) β -sesquifelandreno, (6) borneol, (7) acetato de bornil, (8) δ -elemene, (9) limoneno, (10) isougenol, (11) linalol, (12) sabineno, (13) selina-4(15),7(11)-dien-8-one, (14) 2-terc-butil-1,4-dimetoxibenzeno, (15) éter dimetil timohidroquinona.



Fonte: MORAES *et al.* (2022)

Os estudos relatam principalmente o uso das folhas de *A. triplinervis*, sendo utilizadas para infusões e decocções para uso interno, e o sumo/suco para uso externo. Abaixo, a Tabela 3 que descreve a utilização popular em vários países.

Tabela 3 - Uso popular da *Ayapana triplinervis* em diferentes países do mundo

País	Alegação de uso
Argentina	Promover a menstruação; tratamento de tumores
Brasil	Adstringente; aftas; angina; cicatrização; cólera; depurativo; diarreia; digestivo; disenteria; dor de cabeça; emoliente; escorbuto; estimulante; expectorante; febre; gengivite; gripe; hemorroida; dor urinária; inflamação na garganta; insônia; malária; náuseas; picadas de cobra; problemas oftálmicos; problemas no ouvido; resfriados; sudorífico; tétano; tônico; tosse; tuberculose; irritações bucais; úlcera gástrica; verminose; vômito.
Bangladesh	Febre
Estados Unidos	Cólera; indigestão; complicações respiratórias
Guianas	Digestivo; dor de cabeça; febre; gripe; hipertensão arterial, náuseas; resfriado; sudorífico; irritações bucais; vômitos
Ilha da Reunião	Malária
Ilhas Maurício	Cicatrização; colite; diarreia; digestivo; dor estomacal; dor de cabeça; inflamação; resfriado; verminose; vômito
Índia	Acne; anemia; antisséptico; cicatrização; constipação intestinal; digestivo; dor nas articulações; estimulante; estimulante cardíaco; hemorragia; hemostática; hipertensão arterial; sudorífico; tônico
Filipinas	Febre; sudorífico; tônico
Paquistão	Adstringente; digestivo; dor de cabeça; escorbuto; febre; gripe; problemas nos ouvidos; tosse; úlceras
Peru	Adstringente; cicatrização; cólica; depurativo; diarreia; dor estomacal; edema estimulante hemorragia; dor urinária; picada de cobra; sudorífico; tétano; tumor
Trinidad e Tobago	Promover a menstruação; verminose; gripe; constipação; pneumonia; febre amarela.

Fonte: Adaptado de PAIXÃO, 2016.

Os óleos essenciais dos diferentes morfotipos de *A. triplinervis* são suscetíveis à volatilização e oxidação por oxigênio e luz, afetando a atividade biológica de seus constituintes. Uma forma de prevenir a degradação e oxidação é por meio do uso de sistemas de nanoemulsões, que oferecem vantagens como facilidade de manuseio, estabilidade, proteção antioxidante, melhor distribuição e liberação controlada (RODRIGUES *et al.*, 2021).

3.4 SISTEMA NANOEMULSIONADO

Uma das aplicações mais promissoras da nanotecnologia é a formulação de nanoemulsões. Segundo Solans e Solé (2012), as nanoemulsões são sistemas coloidais constituídos por dois líquidos imiscíveis na qual a fase interna está em escala nanométrica, usualmente entre 20 a 200 nm. Os métodos de baixo aporte de energia são especialmente interessantes, incluindo-se a emulsificação espontânea e os que envolvem inversão de fases. A adição de um emulsificante é fundamental para a criação de gotas de tamanho pequeno, pois diminui a tensão interfacial entre as fases oleosa e aquosa da emulsão, permitindo que as gotas sejam dispersas uniformemente. O emulsificante também desempenha um papel na estabilização das nanoemulsões, por meio de interações eletrostáticas repulsivas e impedimento estérico (ASSIS *et al.*, 2012).

Os sistemas nanoemulsionados permitem a penetração rápida de espécies ativas, pois gotas de tamanho pequeno permitem que elas sejam depositadas uniformemente no substrato, aprimoradas pela baixa tensão superficial e baixa tensão óleo/água (O/A). No entanto, em muitos casos, a preparação de nanoemulsões requer técnicas especiais de aplicação, cuja produção é cara (AGNIHOTRI *et al.*, 2019).

As nanoemulsões O/A são compostas por pequenas gotículas de óleo dispersas em um meio aquoso, enquanto as nanoemulsões água/óleo (A/O), são caracterizadas por pequenas gotículas de água dispersas em um meio oleoso. Nas nanoemulsões O/A, as gotas são tipicamente revestidas por um emulsificante hidrofílico, enquanto nas nanoemulsões A/O, as gotas são revestidas por um emulsificante lipofílico (McCLEMENTS; JAFARI, 2018).

Os métodos de preparação podem ser divididos em dois grupos principais: métodos de alto aporte de energia e métodos de baixo aporte de energia. Entre os métodos de alto aporte de energia, a homogeneização de alta pressão e a ultrassonificação são os mais utilizados (ZHANG *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2019).

Esses métodos utilizam uma grande quantidade de energia para diminuir o tamanho das partículas, o que pode afetar a estabilidade da emulsão (LIU *et al.*, 2019). Por outro lado, os métodos de baixo aporte de energia são mais suaves e utilizam propriedades específicas do sistema para formar as nanoemulsões. O ponto de inversão de emulsão e a temperatura de inversão de fase são exemplos de métodos de baixa energia que podem produzir nanoemulsões estáveis e com tamanho uniforme (ZHOU *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2021).

Para formular nanoemulsões, a fase oleosa utilizada pode ser composta por componentes hidrofóbicos, como os óleos essenciais; a fase aquosa é tipicamente composta principalmente de água e adiciona-se um emulsificante, que é uma molécula anfifílica de superfície ativa que durante a homogeneização, reduz a tensão interfacial. Nanoemulsões geralmente não podem ser formadas simplesmente homogeneizando as fases de óleo e água em conjunto, porque o sistema se separa rapidamente em suas fases componentes (WILSON *et al.*, 2021).

Uma das vantagens dos sistemas nanoemulsionados para atividade antibacteriana é a sua capacidade de aumentar a eficácia dos agentes antibacterianos, uma vez que a redução do tamanho das partículas aumenta a área de contato entre o agente ativo e a bactéria-alvo. Além disso, as nanoemulsões possuem estabilidade e uniformidade, o que permite uma melhor distribuição do agente antimicrobiano no local de aplicação (AGNIHOTRI *et al.*, 2019).

Outra vantagem é que as nanoemulsões possuem uma alta capacidade de penetração em membranas celulares bacterianas devido ao seu tamanho nanométrico, o que aumenta a interação do agente ativo com as células-alvo. Além disso, a baixa tensão superficial das nanoemulsões permite que elas penetrem facilmente na superfície da bactéria, aumentando ainda mais a eficácia antibacteriana (LYRA, 2019).

3.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS NANOEMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Estudos demonstraram que as nanoemulsões são adequadas para aumentar a eficácia dos óleos essenciais contra uma ampla gama de microrganismos, incluindo bactérias, ao converter o óleo essencial em gotículas nanométricas. Panpalia *et al.* (2019) investigou e avaliou a atividade antibiofilme de uma nanoemulsão à base de óleo de cravo contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* resistentes

à metilina. A nanoemulsão foi preparada utilizando o método de emulsificação de alta pressão e foi caracterizada quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta e microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados do estudo indicaram que a nanoemulsão de óleo de cravo foi eficaz na inibição do crescimento e formação de biofilme dos microrganismos testados, sugerindo seu potencial como uma alternativa aos antimicrobianos convencionais.

O estudo de Lyra (2019) avaliou a atividade antibacteriana do óleo essencial de palmarosa e seu principal componente, o geraniol. As nanoemulsões testadas contra a bactéria *Cutibacterium acnes* indicaram atividade contra a bactéria.

Sugumar *et al.* (2014) também investigaram a eficácia de nanoemulsões contendo óleo essencial de eucalipto na inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, utilizando a técnica de emulsificação por microfluidização de alta pressão, os resultados indicaram que as nanoemulsões foram capazes de inibir o crescimento bacteriano em concentrações baixas, apresentando potencial aplicação como alternativa ao uso de antibióticos convencionais.

Outro estudo feito por Moghimi *et al.* (2016) investigou o uso de conservantes naturais em alimentos, com foco em óleo essencial de *Thymus daenensis*. A formulação da nanoemulsão utilizou ultrassom de alta intensidade. Os resultados mostraram que a atividade antibacteriana do óleo essencial contra *Escherichia coli* foi consideravelmente aumentada quando nanoemulsão, o que foi atribuído ao acesso mais fácil dos óleos essenciais às células bacterianas.

Sendo assim, os estudos citados demonstram que as nanoemulsões apresentam grande potencial como agentes antibacterianos, sendo uma alternativa promissora para a formulação de novos medicamentos. A nanoestruturação dos sistemas pode melhorar a eficácia dos compostos ativos, reduzir a toxicidade e aumentar a estabilidade química e física, tornando esses sistemas uma alternativa segura e eficiente para o controle de microrganismos patogênicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AQUISIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Ayapana triplinervis*

O laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica da UNIFAP cedeu os óleos essenciais das folhas de *Ayapana triplinervis*, os morfotipos A e B foram coletados no distrito de Fazendinha (S 0°03'69.55 W 51°11'03.77), em Macapá, Amapá. As amostras foram identificadas pelo doutor Patrick Cantuária e depositadas no Herbarium Amapaense (HAMAB) do Instituto de Pesquisa Científica e Tecnológica de Amapá (IEPA) sob os códigos ABLR001-HAMAB e ABLR002-HAMAB. O acesso às amostras da planta foi autorizado pelo Conselho Brasileiro de Gerenciamento do Patrimônio Genético sob o número de registro AC90152.

Após a coleta, as folhas foram desidratadas em estufa com circulação de ar a 36 °C antes de serem submetidas à extração por hidrodestilação em um aparelho do tipo Clevenger a 100 °C durante duas horas (BRASIL, 2010).

4.2 REAGENTES E MEIOS DE CULTURA

- Polissobarto 80 (Twenn 80) (Sigma-Aldrich)
- Polissorbato 20 (Twenn 20) (Praid – São Paulo, Brasil)
- Ágar Muller-Hinton (HiMedia, Índia)
- Ágar MacConkey (HiMedia, Índia)
- Ágar Sal Manitol (HiMedia, Índia)
- Caldo Nutriente (HiMedia, Índia)
- Resazurina (Sigma, Aldrich)

4.3 PREPARO DA NANOEMULSÃO

As nanoemulsões foram preparadas com o óleo essencial de *A. triplinervis* (morfótipos A e B) pelo método de baixa energia por emulsificação por inversão de fase (Oliveira *et al.*, 2017), que envolve a titulação de uma fase aquosa em uma fase orgânica com agitação constante à temperatura ambiente. A fase orgânica foi formada pela adição do surfactante ao óleo e homogeneizada por 30 minutos a 750 rpm. Em seguida, a fase aquosa foi adicionada no sentido horário e submetida a um agitador magnético por 60 minutos. A concentração final de óleo essencial foi de 25.000 µg.mL e a razão surfactante / óleo (SOR) igual a 1: 1. Uma mistura de surfactantes não

iônicos com valor de equilíbrio hidrofílico-lipofílico variável (Polissorbatos 80 HLB:15, Polissorbatos 20 HLB: 16,7) foi usado para atingir o valor de EHL 16.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A análise de espectroscopia de correlação de fótons (PCS) foi realizada usando equipamento Zetasizer Nano Zs (Malvern, Reino Unido) com laser vermelho de 10 mW ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$). As nanoemulsões foram diluídas em água deionizada (1:25, v/v) e analisadas no ângulo 90° . Tamanho das gotículas, índice de polidispersidade, potencial zeta foram avaliados em triplicata e expressos como média e desvio padrão.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL E DA SUA NANOEMULSÃO

Para avaliação da atividade antibacteriana, foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (6538) e *Enterococcus faecalis* (29212), e bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli* (8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (25853). Todas as cepas utilizadas na pesquisa foram fornecidas pela FIOCRUZ e mantidas em solução de glicerol em ultrafreezer a -80°C .

4.6 PREPARO DO INÓCULO BACTERIANO

Após 24 horas de incubação da placa, o inóculo foi ajustado para aproximadamente 2×10^8 UFC/mL, utilizando-se uma leitora de microplacas, que corresponde a 0,5 na escala de McFarland (CLSI, 2012). Para isso, foram coletadas 3-4 colônias da placa de Petri, ressuspensas em 3 mL de caldo nutriente e levadas para leitura no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 630 nm. O branco utilizado para leitura foi o caldo nutriente. Após o ajuste na concentração ideal para a continuidade da análise, o inóculo foi incubado por 1 hora a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ em estufa. E posteriormente o inóculo foi diluído à concentração de 10^3 UFC/mL, concentração adequada para se realizar o experimento.

4.7 DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS A SEREM TESTADAS

Os óleos essenciais de *A. triplinervis* (morfortipo A e B) foram diluídos em Tween 20 (10%), na concentração de 25 mg/mL, assim como as nanoemulsões. Posteriormente foram preparadas soluções mãe na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, que

foi diluída de maneira seriada para alcançar as concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL.

4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA - CIM

O ensaio para a determinação do CIM foi realizado pelo método de microdiluição em caldo. A CIM é definida como a menor concentração de um extrato ou fração que inibe o crescimento de microrganismo e foi adaptada do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Em uma microplaca foram adicionados 100 µL do inóculo (com aproximadamente 10^3 UFC/mL), e 100 µL de cada uma das concentrações definidas do óleo essencial e da nanoemulsão. O controle positivo foi constituído de Cloranfenicol (50µg/mL) para Gram positivas e Gentamicina (10 µg/mL) para Gram negativas; o controle negativo, de 100 µL do inóculo bacteriano em 100µL de TWEEN 20 a 10%. As placas foram cobertas com papel alumínio para evitar a fotodegradação do óleo essencial e seguiram para 24 horas de incubação a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa bacteriológica. Após esse período, foi adicionado 30µL de resazurina 0,01% (fenoxazin-3-ona), incubando novamente a placa a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 3 horas. Em seguida, foi realizada a leitura visual para identificação da CIM, considerando-se a manutenção da coloração de azul como ausência de crescimento, enquanto que a mudança para coloração rosa indicou a reação química de óxido-redução da resazurina em resofurina, sendo interpretada como presença de células viáveis (MONTEIRO *et al.*, 2012). A CIM foi lida pela menor concentração do óleo e nanoemulsão em que ocorreu alguma mudança de coloração.

4.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA - CBM

A CBM foi definida como a menor concentração da amostra que resultou em nenhum crescimento ou menos do que três colônias (99,9% de morte) das bactérias, e foi determinada a partir da retirada de 10µL do conteúdo do poço analisado como positivo após a determinação do CIM e incubadas em placa com ágar Mueller-Hinton a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

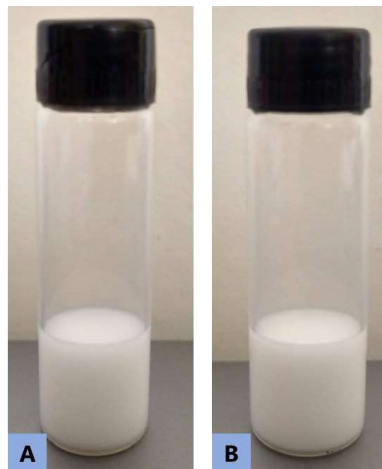
Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a diferença entre as amostras foi avaliada segundo o teste de Tukey a 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

As nanoemulsões com a mistura de surfactantes em EHL 16 do óleo essencial dos morfotipos A e B mostraram-se macroscopicamente estáveis e foram consideradas ótimas, conforme Figura 3. A análise das características das nanoemulsões revelou que a nanoemulsão do morfotipo B apresentou menor tamanho de gotículas em comparação com a nanoemulsão do morfotipo A. Em geral, emulsões com gotículas de menor diâmetro tendem a ser mais estáveis do ponto de vista físico (Bruxel *et al.*, 2012). Ambas as nanoemulsões não apresentaram sinais de cremagem, floculação ou sedimentação, que são fenômenos de instabilidade (McCLEMENTS; JAFARI, 2018). No entanto, nanoemulsões contendo óleos essenciais podem ter menor estabilidade a longo prazo devido a fenômenos de desestabilização, como o amadurecimento de Ostwald (McCLEMENTS; RAO, 2011; RYU *et al.*, 2018).

Figura 3 - Nanoemulsão do morfótipo A (A) e Nanoemulsão do morfótipo B (B) em EHL 16



Fonte: Autoria própria (2023)

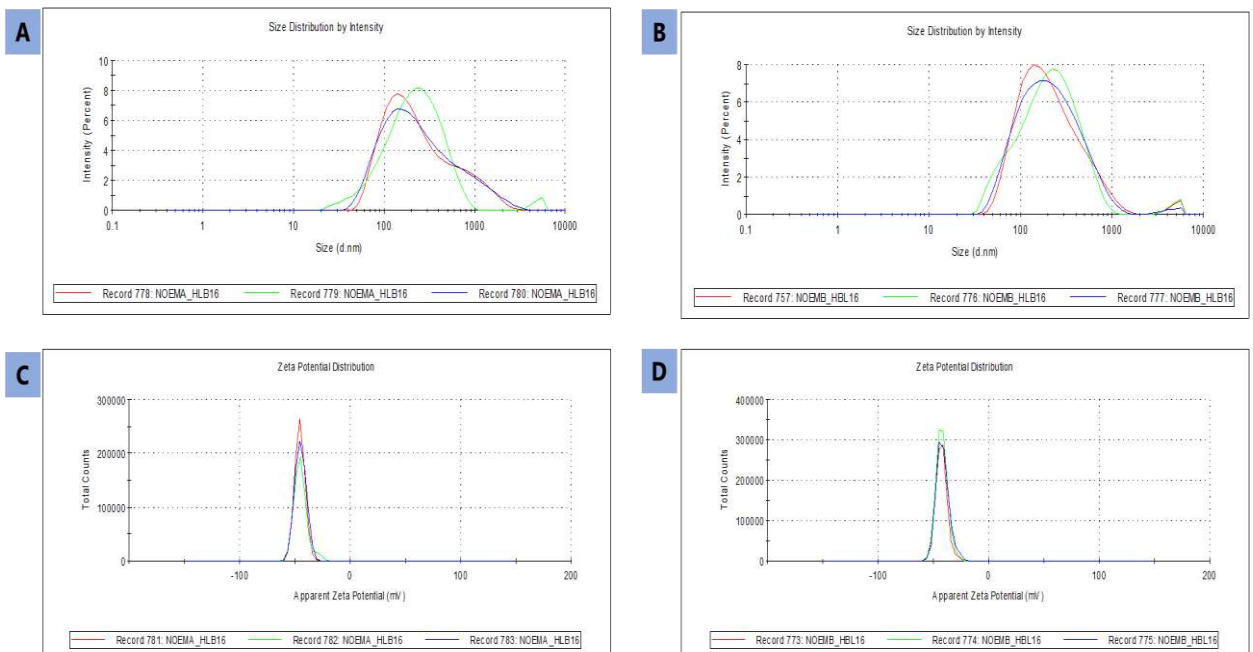
A análise de espectroscopia de correlação de fótons indicou que a nanoemulsão do óleo essencial do morfotipo A apresentou tamanho de partícula de $175,37 \pm 3,60$ nm, índice de polidispersividade $0,369 \pm 0,046$ e potencial zeta igual $-45,7 \pm 4,68$ mV, enquanto que a nanoemulsão do óleo essencial do morfotipo B apresentou diâmetro hidrodinâmico de $162,20 \pm 0,66$ nm, índice de polidispersividade igual a $0,377 \pm 0,025$ e potencial zeta de $-42,7 \pm 5,08$ mV, como demonstrado na Figura 4.

Nanoemulsões são caracterizadas por diâmetros de partículas variando entre 20 e 200 nm. Nesse intervalo, possuem estabilidade contra cremação, floculação e sedimentação. Na análise das amostras, observou-se que o tamanho das gotículas foi menor que 200 nm, e os valores de índice de polidispersão (Pdl), o que indica uma distribuição homogênea do tamanho das partículas (McCLEMENTS; JAFARI, 2018; SOLANS; SOLÉ, 2012).

Quando a distribuição de tamanho de partícula em uma nanoemulsão é monomodal, o Pdl de 0,3 ou menos indica uma distribuição homogênea de gotículas (Danaei *et al.*, 2018). Nas nanoemulsões dos morfotipos A e B, o índice de polidispersão, indica que as partículas possuem tamanho uniforme e distribuição homogênea, tornando a nanoemulsão estável contra o amadurecimento de Ostwald.

O potencial zeta, é influenciado pela distribuição superficial de cargas em nanoemulsões, um indicativo da estabilidade eletrostática do sistema. Valores em torno de ± 30 mV sugerem repulsão eletrostática entre as partículas, evitando a floculação em nanoemulsões (Neves *et al.*, 2016). Portanto, do ponto de vista do potencial zeta, as nanoemulsões mostraram-se estáveis ao longo do tempo.

Figura 4 - Distribuição de tamanho de partícula (A) e Potencial Zeta (C) da nanoemulsão do óleo essencial do morfotipo A, e Distribuição de tamanho de partícula (B) e Potencial Zeta (D) da nanoemulsão do óleo essencial do morfotipo B de *Ayapana triplinervis*.



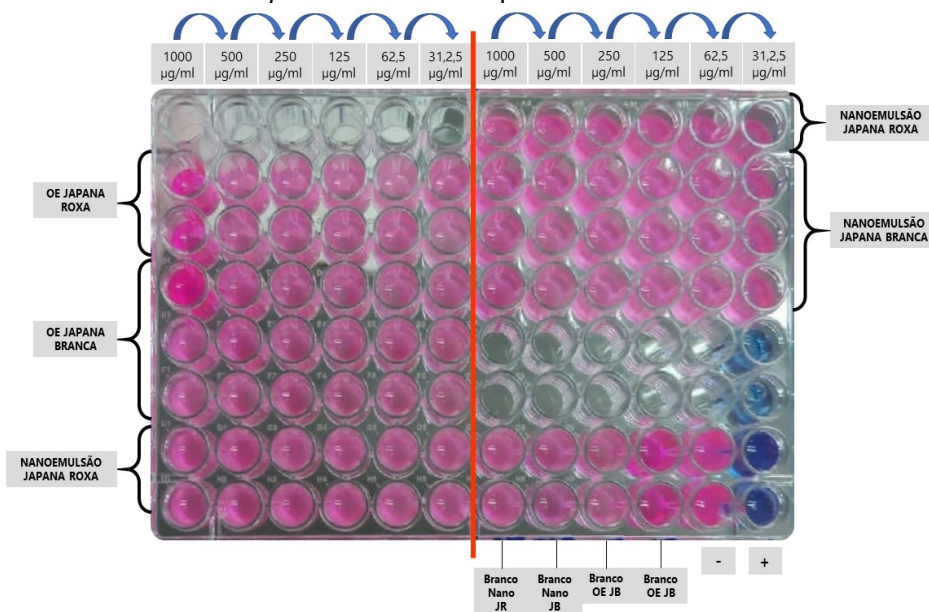
Fonte: Autoria própria (2023)

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *A. triplinervis* E SUA NANOEMULSÃO CONTRA CEPAS BACTERIANAS

Os resultados obtidos a partir da avaliação do óleo essencial das folhas de *A. triplinervis* e sua nanoemulsão indicaram que não houve atividade antibacteriana significativa contra as bactérias testadas, uma vez que em todas as concentrações avaliadas, não foi observada inibição do crescimento bacteriano. Além disso, a coloração rosa na aplicação da resazurina indica que as bactérias permaneceram metabolicamente ativas.

A Figura 5 apresenta os resultados da avaliação antibacteriana do óleo essencial e da nanoemulsão de *A. triplinervis* sobre a cepa de *Staphylococcus aureus*. Observou-se que nem o óleo essencial nem a nanoemulsão afetaram a viabilidade celular, sugerindo que ambos não tiveram efeito sobre a bactéria, nas concentrações avaliadas.

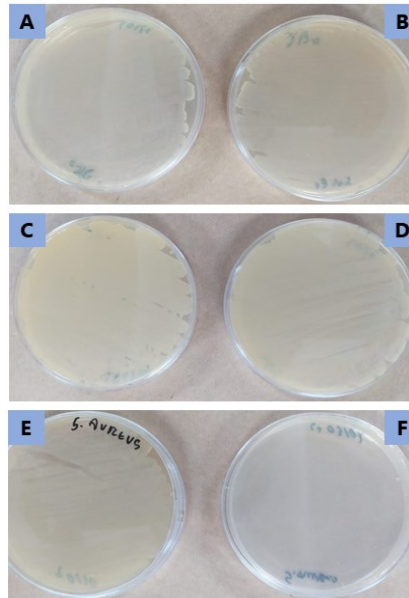
Figura 5 - Resultado da avaliação antibacteriana do óleo essencial e nanoemulsão de *Ayapana triplinervis* sobre a cepa de *S. aureus*.



Fonte: Autoria própria (2023)

Para verificar o crescimento da bactéria em condições favoráveis e, assim, permitir uma comparação, foi realizado o teste de controle de crescimento, cujos resultados são apresentados na figura 6.

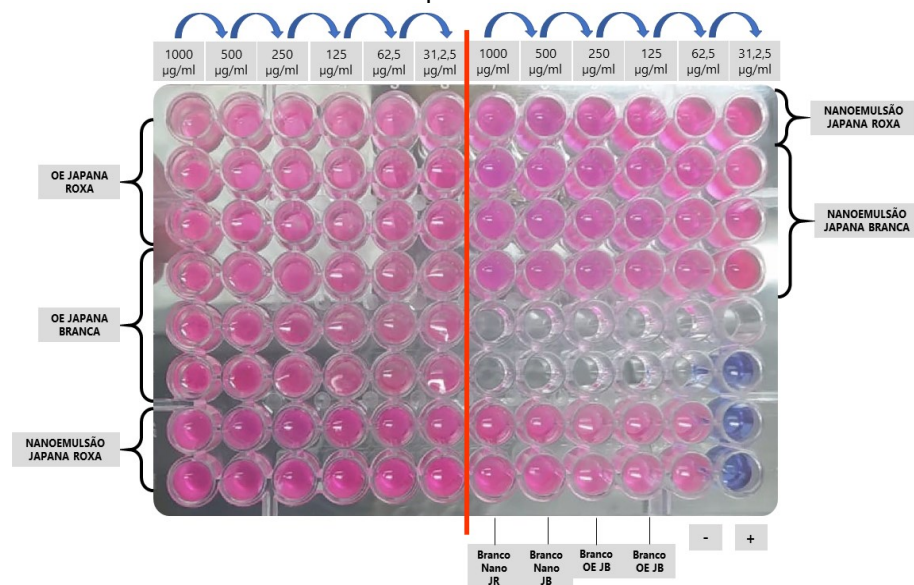
Figura 6 - Resultado do crescimento microbiano *S. aureus*.
 A - OE de Japana branca. B - OE de Japana roxa. C - Nanoemulsão OE de Japana branca. D - Nanoemulsão OE de Japana roxa. E - Controle negativo. F - Controle positivo.



Fonte: Autoria própria (2023)

No experimento realizado com *Enterococcus faecalis*, a presença de bactérias viáveis foi detectada após a aplicação da resazurina. Isso significa que as bactérias estavam vivas e metabolicamente ativas (figura 7).

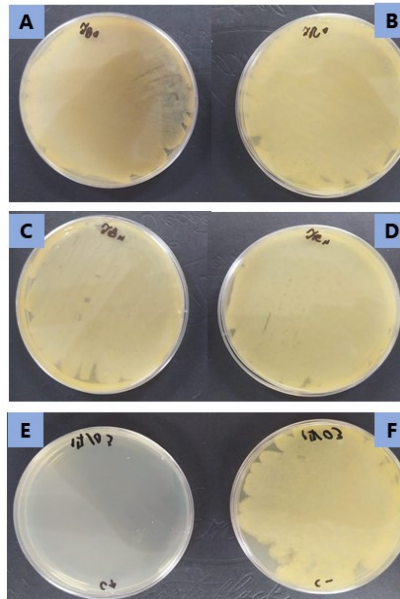
Figura 7 - Resultado da avaliação antibacteriana do óleo essencial e nanoemulsão de *A. triplinervis* sobre a cepa de *E. faecalis*.



Fonte: Autoria própria (2023)

Foi realizado o teste de controle de crescimento, para verificar o crescimento da bactéria em condições favoráveis e assim comparar (figura 8).

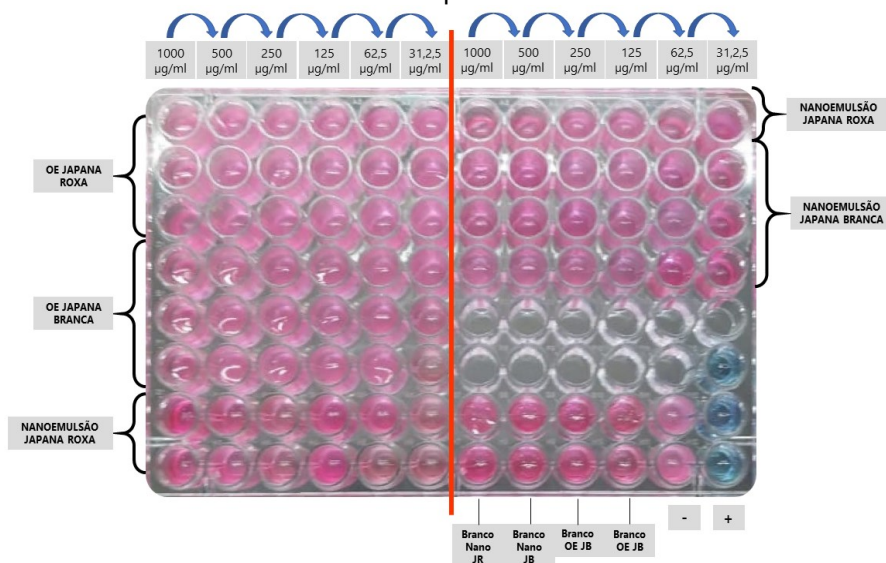
Figura 8 - Resultado do crescimento microbiano *P. aeruginosa*.
 A - OE de Japana branca. B - OE de Japana roxa. C - Nanoemulsão OE de Japana branca. D - Nanoemulsão OE de Japana roxa. E - Controle negativo. F - Controle positivo



Fonte: Autoria própria (2023)

Quando avaliado o comportamento do óleo essencial das folhas de *A. triplinervis* quanto sua nanoemulsão sobre o crescimento de bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, verificou-se que nenhuma concentração foi capaz de inibir ou atuar de forma bactericida (figura 9).

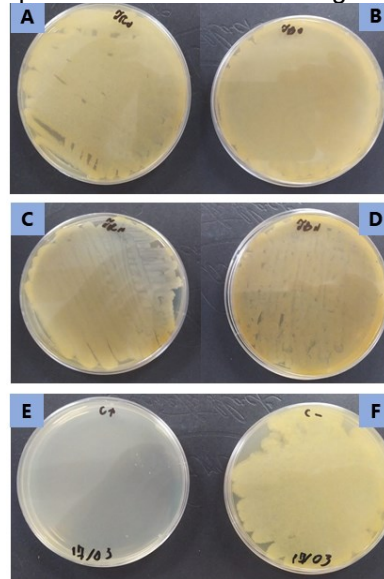
Figura 9 - Resultado da avaliação antibacteriana do óleo essencial e nanoemulsão de *A. triplinervis* sobre a cepa de *E. coli*.



Fonte: Autoria própria (2023)

Foi realizado o teste de controle de crescimento para verificar o crescimento da bactéria em condições favoráveis e, assim, permitir uma comparação (Figura 10).

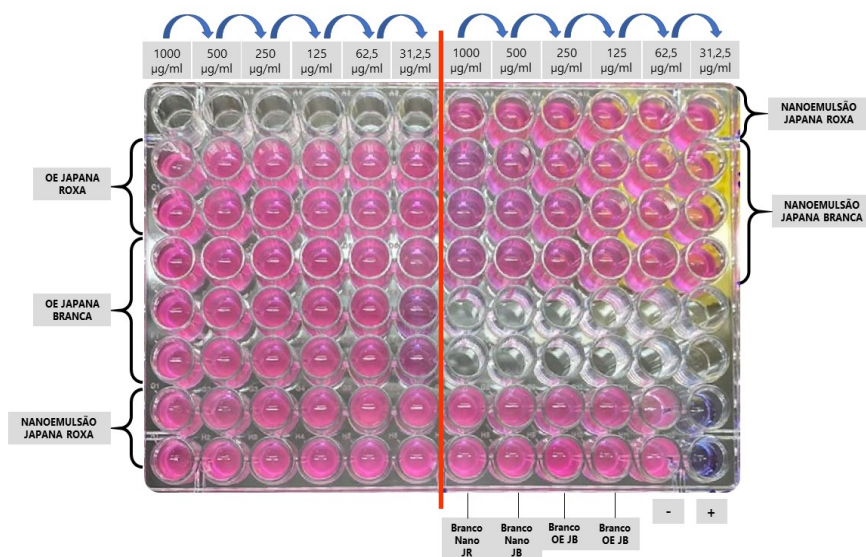
Figura 10 - Resultado do crescimento microbiano *E. coli*
 A - OE de Japana branca. B - OE de Japana roxa. C - Nanoemulsão OE de Japana branca. D - Nanoemulsão OE de Japana roxa. E - Controle negativo. F - Controle positivo.



Fonte: Autoria própria (2023)

Em relação a *Pseudomonas aeruginosa*, os resultados indicam que o sistema nanoemulsionado do óleo essencial das folhas de *A. triplinervis* também não apresentou atividade antibacteriana. Após a aplicação da resazurina na placa em incubação por 24 horas, foi observada uma mudança na coloração dos poços para rosa, indicando a presença de bactérias viáveis, por meio da ocorrência da reação de oxido-redução da resazurina em resofurina (figura 11).

Figura 11 - Resultado da avaliação antibacteriana do óleo essencial e nanoemulsão de *Ayapana triplinervis* sobre a cepa de *P. aeruginosa*.

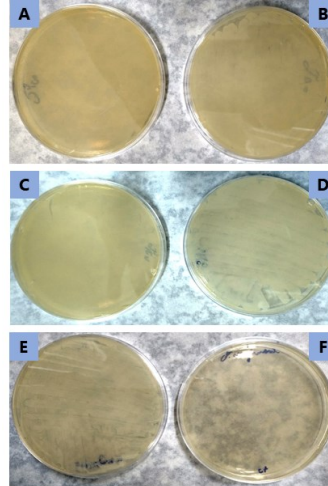


Fonte: Autoria própria (2023)

Foi realizado o teste de controle de crescimento para verificar o crescimento da bactéria em condições favoráveis e, assim, permitir uma comparação (figura 12).

Figura 12 - Resultado do crescimento microbiano *P. aeruginosa*.

A - OE de Japana branca. B - OE de Japana roxa. C - Nanoemulsão OE de Japana branca. D - Nanoemulsão OE de Japana roxa. E - Controle negativo. F - Controle positivo.



Fonte: Autoria própria (2023)

Os resultados mostraram que o óleo essencial e a nanoemulsão do óleo essencial de *A. triplinervis* não apresentaram atividade antibacteriana contra as cepas testadas. No entanto, pesquisas adicionais são necessárias para determinar se o óleo essencial e a nanoemulsão do óleo essencial de *A. triplinervis* têm atividade potencial contra outras cepas ou em combinação com outros agentes antimicrobianos.

Embora não tenham sido observados resultados da atividade antibacteriana do óleo essencial e da nanoemulsão de *A. triplinervis* neste estudo, a atividade antibacteriana da *A. triplinervis* foi relatada em estudos anteriores.

Lopes *et al.* (2014) utilizaram diferentes extratos de partes de *A. triplinervis* e avaliaram seu potencial antibacteriano. O extrato hidroalcolóico (obtido das folhas) apresentou melhor atividade para bactérias Gram negativas, com CIM de 94µg/mL, enquanto que o extrato metanólico exibiu melhor atividade tanto contra bactérias Gram negativas quanto Gram positivas. Contra *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, o extrato apresentou valores de CIM de 62 e 75 mg/mL, respectivamente. Já contra as Gram negativas, a CIM foi de aproximadamente 125mg/mL. Quando avaliado o fracionamento do extrato, as frações hexano e diclorometano/acetato de etila exibiram os melhores valores de CIM e CBM contra *Escherichia coli* a 16 e 31 mg/mL, respectivamente. A fração de diclorometano, foi a

mais eficaz contra *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, com valores de CIM de 31 e 62 mg/ml, respectivamente, e o valor de CBM de pelo menos 12,5 mg/mL.

Sugumar *et al.* (2015) também realizaram um estudo sobre a atividade antibacteriana do óleo de *A. triplinervis* em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas usando a técnica de disco difusão, obtendo melhores resultados contra *Salmonella typhi* e *Shigella sonnei* com halos de inibição de aproximadamente 20mm. O estudo também constatou que, dentre as bactérias selecionadas para o experimento com uma concentração de 20µl por disco, a inibição foi mais significativa em *Salamella typhi* (21 mm), seguida de *Shigella sonnei* (18 mm). Em relação a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli*, o óleo essencial apresentou uma concentração inibitória mínima (CIM) mais alta (21000 ppm), o que demonstrou que o óleo exibiu atividade antibacteriana.

Além disso, Unnikrishnan *et al.* (2014) avaliaram a atividade antibacteriana do óleo essencial de *A. triplinervis* e do composto majoritário isolado, o éter dimetil timohidroquinona, contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Penicillium chrysogenum*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*. A concentração de 4 mg/disco do óleo essencial apresentou atividade contra todos os microrganismos testados, exceto *Aspergillus sp.* O composto majoritário, éter dimetil timohidroquinona exibiu menor atividade antimicrobiana quando comparado ao óleo essencial, sugerindo que o fitocomplexo presente no óleo essencial pode atuar sinergicamente para a atividade antimicrobiana.

No óleo essencial de *A. triplinervis*, foram identificados como compostos principais o éter dimetil timohidroquinona e o β -cariofileno (RODRIGUES *et al.*, 2021). O β -cariofileno é um sesquiterpeno encontrado em várias espécies da família Astereaceae, e tem sido relatado por outros estudos como possuindo atividades anti-inflamatória, antibiótica, inseticida, antioxidante e anticarcinogênica (LIMA *et al.*, 2020; TOSCAN, 2014).

Em outro estudo realizado por Haddad *et al.* (2019), o óleo essencial de *A. triplinervis* e o éter dimetil timohidroquinona foram investigados quanto ao seu potencial antiviral contra o vírus Zika (ZIKV). Os resultados mostraram que o óleo essencial e o éter dimetil timohidroquinona foram capazes de inibir a infecção pelo ZIKV em células humanas, em concentrações não citotóxicas, sugerindo que podem ser considerados como novos compostos potentes contra o ZIKV.

As atividades biológicas dos OEs estão correlacionadas a complexas interações entre as muitas substâncias que fazem parte da sua composição. No entanto, fatores externos, como variações geográficas e sazonais, condições ambientais, momento da colheita, processos de secagem, técnica de extração e armazenamento, podem levar a mudanças na composição química dos OEs (LIANG *et al.*, 2004).

Além disso, a polaridade dos extratos e compostos também pode influenciar a eficácia antimicrobiana, com estudos sugerindo que compostos polares são mais eficazes contra bactérias Gram-negativas, enquanto compostos apolares são mais eficazes contra bactérias Gram-positivas (CAVALCANTE, 2012). É importante ressaltar, no entanto, que a atividade antimicrobiana é influenciada por diversos fatores, como a concentração do extrato ou composto, o tempo de exposição e a cepa bacteriana ou fúngica.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio do presente estudo, objetivou-se avaliar o potencial de atividade antimicrobiana do óleo essencial e da nanoemulsão de *Ayapana triplinervis*, visando explorar o potencial de ativos naturais como alternativa para o uso de antimicrobianos, especialmente no combate a microrganismos resistentes. Entretanto, os resultados dos testes realizados com *A. triplinervis*, tanto em relação ao seu óleo essencial quanto à nanoemulsão, utilizando a metodologia de microdiluição em caldo contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, não se mostraram promissores, e a hipótese de que a nanoemulsão potencializaria a atividade antimicrobiana do óleo essencial foi refutada, uma vez que as concentrações da nanoemulsão contendo o óleo essencial não demonstraram eficácia frente às bactérias testadas até o momento.

Contudo, é importante ressaltar que esta pesquisa contribui para o acervo de registros científicos acerca dos óleos essenciais e de seu sistema nanoemulsionado, assim como as potenciais atividades biológicas relacionadas ao uso da *Ayapana triplinervis*. Os trabalhos publicados evidenciam a necessidade de prosseguir com pesquisas a fim de se compreender plenamente o potencial farmacológico desta planta.

REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, N.; SONI, G. C.; CHANCHAL, D. K.; TIWARI, S.; FANG, J. Y. Uma revisão científica sobre nanoemulsão para direcionar o sistema de entrega de medicamentos. **International Journal Life Sciences**, v. 5, n. 2, p. 16-29, 2019.
- ALJAAFARI, M. N. et al. An overview of the potential therapeutic applications of essential oils. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 628, 2021.
- ALONSO, L. **Óleos Essenciais Como Alternativa Natural Para a Conservação De Alimentos**. TCC - Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Uberlândia. Pato de Minas, 2022.
- ARENZ, S.; WILSON, D. N. Bacterial Protein Synthesis as a Target for Antibiotic Inhibition. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 9, 2016.
- ARIMA, H.; ASHIDA, H.; DANNO, G. Rutin-enhanced Antibacterial Activities of Flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 5, p. 1009–1014, 2002.
- ASSIS, D. C. R. Nanoemulsões: características de preparação e aplicações na indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, 2012.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BRASIL. **Farmacopeia brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v. 546. v.2, 2010.
- BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.
- CAVALCANTE, M. A. Estudo do potencial antimicrobiano e antioxidante de espécies vegetais amazônicas. Orientador: Jesus Nazareno Silva de Souza e Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco. Belém, 2012.
- CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 58, 2017.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition (M07-A9). **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2012.
- CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343–356, 2005.
- DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

EL ATKI, Y. et al. Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 10, n. 2, p. 63, 2019.

FIGUEIREDO, H. R.; CARVALHO, V. R. J. **ALIMENTOS FUNCIONAIS: Compostos bioativos e seus efeitos benéficos à saúde**. Disponível em: <<http://repositorio.unis.edu.br/bitstream/prefix/460/1/ALIMENTOS%20FUNCIONAIS%20Compostos%20bioativos%20e%20seus%20efeitos%20ben%a9ficos%20%20c3%a0%20sa%20c3%bade.pdf>>. Acesso em 30 de março 2023.

GARCIA, M. P. Solubility of essential oils in water and its influence on the antimicrobial activity. **Molecules**, v. 18, n. 7, 2013.

GAUVIN-BIALECKI, A.; MARODON, C. Essential oil of *Ayapana triplinervis* from Reunion Island: A good natural source of thymohydroquinone dimethyl ether. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 11, p. 853–858, 2008.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

GUPTA, D.; CHARLES, R.; GARG, S. N. Chemical Composition of the Essential Oil from the Leaves of *Eupatorium triplinerve* Vahl. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 5, p. 473–475, 2004.

HADDAD, J. G. et al. *Ayapana triplinervis* Essential Oil and Its Main Component Thymohydroquinone Dimethyl Ether Inhibit Zika Virus at Doses Devoid of Toxicity in Zebrafish. **Molecules**, v. 24, n. 19, p. 3447, 2019.

IRANI, M. et al. Leaves Antimicrobial Activity of *Glycyrrhiza glabra* L. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 9, n. 4, p. 425–428, 2010.

IYER, L. M.; KOONIN, E. V.; ARAVIND, L. Evolutionary connection between the catalytic subunits of DNA-dependent RNA polymerases and eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases and the origin of RNA polymerases. **BMC Structural Biology**, v. 3, p. 1, 2003.

JAYARAMAN, P.; SAKHARKAR, M.K.; LIM, C.S.; TANG, T.H.; SAKHARKAR, K.R. Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. **International journal of biological sciences**, v. 6, n. 6, p. 556–68, 2010.

LI, J. et al. Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, 2017.

LIANG, Yi-Zeng; XIE, Peishan; CHAN, Kelvin. Quality control of herbal medicines. **Journal of chromatography B**, v. 812, n. 1-2, p. 53-70, 2004.

LIMA, T. C. P. et al. Desenvolvimento de nanogel de *Copaifera reticulata* sobre a lesão muscular em ratos usando fonoforese. **Saúde e Pesquisa**, v. 13, n. 1, p. 181–192, 2020.

LIU, J. et al. Ultrasonic assisted enzymolysis preparation of egg-yolk lecithin-based flaxseed oil nanoemulsion and evaluation of its physicochemical and functional properties. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 285-292, 2019.

LOPES, T. R. M. et al. Antimicrobial bioassay-guided fractionation of a methanol extract of *Eupatorium triplinerve*. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 6, p. 897–903, 2014.

LYRA, L. P. S. **Desenvolvimento de nanoemulsão de geraniol e óleo essencial da palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e sua ação inibitória sobre linhagens de *Cutibacterium acnes***. 2019.

MAIA, J. G. S. Essential Oils of *Eupatorium triplinerve* Vahl and *E. paniculatum* Poepp. et Endl. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, n. 5, p. 4, 1999.

McCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. General aspects of nanoemulsions and their formulation. In: JAFARI, S. M.; McCLEMENTS, D. J. (Eds.). **Nanoemulsions: formulation, applications and characterization**. Elsevier Inc, p. 3-20, 2018.

McCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285–330, 2011.

MOGHIMI, R. et al. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. **Food Chemistry**, v. 194, p. 410–415, 2016.

MONTEIRO, M. C. et al. A New Approach to Drug Discovery: High-Throughput Screening of Microbial Natural Extracts against *Aspergillus fumigatus* Using Resazurin. **Journal of biomolecular screening**, v. 17, n. 4, p. 542–549, abr. 2012.

MOIR, D. Identification of Inhibitors of Bacterial Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase. **Current Drug Target -Infectious Disorders**, v. 5, n. 3, p. 297–305, 2005.

MORAES, C. S. P. DE et al. Estudos Tradicionais, Fitoquímicos e Biológicos de *Ayapana triplinervis* (Vahl) R.M. King & H. Robinson: Estado da arte. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, p. e6411628648–e6411628648, 2022.

NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, 2000.

NERY, M. I. S. et al. Morfoanatomia do eixo vegetativo aéreo de *Ayapana triplinervis* (Vahl) R.M. King & H. Rob. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 1, p. 62–70, 2014.

NEVES, A. et al. Nanoscale Delivery of Resveratrol towards Enhancement of Supplements and Nutraceuticals. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 131, 2016.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M. et al. Utilization of dynamic light scattering to evaluate *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion formation by non-heating and

solvent-free method. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 3, p. 401–406, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Antimicrobial resistance**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. 2021. Acesso em 30 de março de 2023.

PAIXÃO, T. P. **Estudo Fitoquímico E Avaliação Do Efeito Antinociceptivo De Uma Fração Rica Em Cumarina de Ayapana triplinervis (Asteraceae)**. Dissertação de Mestrado - Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Pará, Belém, 2016

PANPALIA, G. et al. Clove oil based nanoemulsion: Formulation, characterization and evaluation of its antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 137, p. 103-790, 2019.

RODRIGUES, A. B. L.; LOPES, R. M.; RABELO, É. M.; TOMAZI, R.; SANTOS, L. L.; BRANDÃO, L. B.; FAUSTINO, C. G.; FARIAS, A.L.F.; DOS SANTOS, C.B. R.; CANTUÁRIA, P. C.; GALARDO, A. K. R.; DE ALMEIDA, S. S. M.S. Development of nano-emulsions based on *Ayapana triplinervis* essential oil for the control of *Aedes aegypti* larvae. **PLOS ONE**, v. 16, n. 7, p. 225-254, 2021.

RYU, V. et al. Effect of ripening inhibitor type on formation, stability, and antimicrobial activity of thyme oil nanoemulsion. **Food Chemistry**, v. 245, p. 104–111, 2018.

SALARI, M. H. et al. Antibacterial effects of *Eucalyptus globulus* leaf extract on pathogenic bacteria isolated from specimens of patients with respiratory tract disorders. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 2, p. 194–196, 2006.

SEOW, Y. X. et al. Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 5, p. 625–644, 2013.

SHIOTA, S. et al. Marked Reduction in the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of BETA- γ -Lactams in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Produced by Epicatechin Gallate, an Ingredient of Green Tea (*Camellia sinensis*). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, n. 12, p. 1388–1390, 1999.

SILVA, L. O. P. DA; NOGUEIRA, J. M. DA R. Resistência bacteriana: potencial de plantas medicinais como alternativa para antimicrobianos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 53, n. 1, 2021.

SOBRINHO, A. C. N. et al. Antifungal and Antioxidant Activities of *Vernonia Chalybaea* Mart. ex DC. Essential Oil and their Major Constituent β -caryophyllene. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, p. e20190177, 2020.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 246–254, 2012.

SUGUMAR, N.; KARTHIKEYAN, S.; GOWDHAMI, T. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil from *Eupatorium triplinerve* Vahl. Aerial Parts. **International Letters of Natural Sciences**, v. 31, p. 14–21, 2015.

SUGUMAR, S. et al. Ultrasonic emulsification of eucalyptus oil nanoemulsion: Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and wound healing activity in Wistar rats. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 3, p. 1044–1049, 2014.

TORRES-ALVAREZ, C. et al. Inclusion Complexes of Concentrated Orange Oils and β -Cyclodextrin: Physicochemical and Biological Characterizations. **Molecules**, v. 25, n. 21, p. 5109, 2020.

TOSCAN, C. M. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides**. 2014.

TUREK, C.; STINTZING, F. C. Impact of different storage conditions on the quality of selected essential oils. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 341-353, 2012.

UNNIKRISHNAN, P. K. et al. Study on *Eupatorium triplinerve* Vahl from South India, A Rich Source for Thymohydroquinone dimethylether and its Antimicrobial Activity. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 17, n. 4, p. 652, 2014.

WANG, X.; ZHU, K.; ZHUANG, H.; LIU, H.; REN, F. Characterization and stability of pickering emulsion-based nanoemulsions stabilized by whey protein nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 338, p. 1-8, 2021.

WILSON, R. J. et al. Nanoemulsions for drug delivery. **Particuology**, v. 64, 8 jun. 2021.

YAO, J.; ROCK, C. O. How Bacterial Pathogens Eat Host Lipids: Implications for the Development of Fatty Acid Synthesis Therapeutics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 10, p. 5940–5946, 2015.

ZHANG, Q. et al. A comparative study on the formation of soy protein isolate and sodium caseinate nanoemulsions by high-pressure homogenization and ultrasonication. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 918-926, 2018.

ZHOU, H. et al. Preparation of tea polyphenol-loaded O/W nanoemulsion and its stability evaluation. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 3, p. 1396-1405, 2019.