



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

MARIANA ALVES BATTISTI

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE NANOCÁPSULAS E NANOEMULSÕES CONTENDO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* CHEEL**

FLORIANÓPOLIS

2021

Mariana Alves Battisti

Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de nanocápsulas e nanoemulsões contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Farmácia
Orientadora: Profa. Dra. Angela Machado de Campos

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

ALVES BATTISTI, MARIANA

Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de nanocápsulas e nanoemulsões contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel / MARIANA ALVES BATTISTI ; orientadora, ANGELA MACHADO DE CAMPOS, 2021.
163 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. MELALEUCA ALTERNIFOLIA. 3. NANOCÁPSULAS E NANOEMULSÃO. 4. SEPSE. 5. ATIVIDADE ANTIVIRAL . I. MACHADO DE CAMPOS, ANGELA. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Mariana Alves Battisti

Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de nanocápsulas e nanoemulsões contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel

Prof.^a Cláudia Maria Oliveira Simões, Dra

Universidade Federal de Santa Catarina




Documento assinado digitalmente
Cláudia Maria Oliveira Simoes
Data: 07/10/2021 15:47:42-0300
CPF: 310.761.810-15
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>



GOV.BR
Débora Fretes Argenta
Data: 29/09/2021 22:07:29-0300
CPF: 005.170.250-94
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Débora Fretes Argenta, Dra

Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente
Tania Beatriz Creczynski Pasa
Data: 04/10/2021 15:46:25-0300
CPF: 551.695.540-87
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

ICP-Edu

Prof.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa Dra

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Farmácia.

Prof.^a. Dr.^a. Thaís Cristine Marques Sincero
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.^a Dr.^a Angela Machado de Campos
Orientadora

Dedico este trabalho ao maior presente que Deus poderia me dar,
minha princesinha Giovana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus, pela vida, minha família e por estar sempre comigo em todos os momentos.

A minha orientadora, Prof. Dra. Angela Machado de Campos, que durante os últimos 11 anos me orientou e me conduziu durante a vida acadêmica na UFSC. Não tenho palavras para agradecer tudo o que você fez por mim. Muito obrigada!!

A minha mãe, pela minha educação e incentivo a sempre buscar meus sonhos. Sem ela não teria chegado até aqui. Espero ser para minha Giovana uma mãe perfeita tanto quanto você é para mim. Te amo!

A minha irmã Jordana e meu irmão William, por estarem presentes em todos os momentos durante esta jornada e por serem perfeitos, cada um do seu jeitinho. Aos meus sobrinhos, Izadora e Arthur, por serem essas crianças maravilhosas e que enchem a família de amor e alegria!!

Ao meu marido Max, por ter estado ao meu lado durante todo o doutorado e ter me presenteado com o maior amor da minha vida, nossa princesinha Giovana.

Ao amor da minha vida, Giovana, por ser a bebê mais doce, amorosa e perfeita do mundo!! Te amo, minha vida!!

Aos amigos e colegas do laboratório, Aline, Rafaela, Paola, Nilson, Beatriz por todos os momentos de descontração dentro e fora do laboratório e pelas grandes trocas de conhecimento durante nossas conversas. Em especial a Dai, Sandra e Rose por serem tão especiais e terem tornado o caminho mais leve.

As minhas companheiras de doutorado e amigas Carine e Edna, por todas as risadas, almoços e perrengues.

À Talitha, por todo apoio e ensinamentos. Muito obrigada!!

As minhas amigas Carol, Denise e Jana, que me acompanham desde o começo da faculdade.

À Luiza, Mauricio e Priscila, meus grandes amigos, por toda amizade e cumplicidade.

Ao Prof. Dr Thiago Caon, pela colaboração e risadas.

Agradeço ao Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto por todo apoio e a Prof. Dra. Izabella Thaís da Silva por disponibilizar seu laboratório para os estudos da atividade antiviral.

A Dra. Larissa Constantino, pela colaboração no estudo *in vivo*.

As demais pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho!

Muito obrigada!!

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota (Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* é um óleo volátil obtido a partir de uma espécie nativa da Austrália conhecida como árvore do chá. Estudos pré-clínicos têm demonstrado que este óleo volátil possui um amplo espectro de atividades biológicas, no entanto já é bem conhecido que óleos voláteis tipicamente apresentam baixa solubilidade e alta volatilidade, limitando o uso como agente terapêutico. A associação de óleos voláteis e sistemas nanoestruturados é uma alternativa promissora para contornar as limitações relacionadas a óleos voláteis e sua utilização como agentes terapêuticos. Dentre os sistemas nanoestruturados, destacam-se as nanoemulsões e nanocápsulas. Nanoemulsões (NE) são compostas de óleo vegetais, sintéticos ou semissintéticos estabilizados por surfactantes. Nanocápsulas (NC) consistem em um núcleo oleoso ou aquoso cercado por uma parede polimérica. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar NE e NC contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* visando obter um produto fitoterápico com atividade antimicrobiana. As técnicas de emulsificação espontânea e nanoprecipitação foram utilizadas para preparação das nanoemulsões e nanocápsulas, respectivamente. Dois estudos de formulação foram realizados para seleção dos componentes das formulações. As nanoemulsões preparadas com o surfactante hidrofílico Pluronic® F68 a 1,5% (m/V) apresentaram-se promissoras, com tamanho de partícula de $146,76 \pm 0,2$ nm, índice de polidispersão de $0,171 \pm 0,1$ e potencial zeta de $-38,3 \pm 0,1$ mV. Em um segundo estudo de formulação, foram preparadas nanocápsulas a partir do polímero Eudragit® RS100 ou policaprolactona (PCL). Nanocápsulas preparadas com Eudragit® RS100 apresentaram tamanho médio de partícula de $197 \pm 0,5$ nm, índice de polidispersão de $0,181 \pm 0,1$ e potencial zeta de $+33 \pm 0,3$ mV e, portanto, menores, menos dispersas e potencialmente mais estáveis que as nanocápsulas obtidas com PCL (tamanho $335 \pm 1,0$ nm, PDI $0,2 \pm 0,1$ e potencial zeta $-22 \pm 0,3$ mV). As nanoemulsões e nanocápsulas não apresentaram modificações significativas de tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e pH ao final de 60 dias a 4 e 25 °C e no índice de instabilidade durante o estudo de estabilidade acelerada. No estudo de fotoestabilidade, as NE permaneceram estáveis durante os primeiros cinco dias e as NC até o final do experimento, demonstrando o efeito protetor do polímero. Em estudo de citotoxicidade em células RAW e HEK não foram observadas diferenças significativas entre o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* livre e os sistemas nanoestruturados. O efeito de NE-TTO e NC-TTO na sepse foi avaliado por modelo ligação e perfuração cecal. Foi observado efeito preventivo do estresse oxidativo no rim e pulmão e redução da inflamação no foco da infecção (lavado peritoneal). Na avaliação da ação antimicrobiana dos sistemas, ambos reduziram significativamente o crescimento bacteriano. A

determinação da atividade anti-herpética, contra o Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) foi avaliada por ensaio de redução do número de placa viral. A citotoxicidade de NE-TTO e NC-TTO e óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* livre foi determinada em células Vero por ensaio Sulforrodamina por 48 h. NE-TTO e NC-TTO apresentaram efeito anti-herpético maior contra o vírus HSV-1 em comparação ao óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* livre.

Palavras-chave: *Melaleuca alternifolia*; nanotecnologia; sistemas nanoestruturados; nanoemulsões; nanocápsulas; atividade antimicrobiana, modelo ligação e perfuração cecal (CLP), sepse, HSV-1

ABSTRACT

The tea tree oil (TTO), which is extracted from *Melaleuca alternifolia*, has shown potential anti-inflammatory, antibacterial, and antiviral activities. On the other hand, essential oils typically exhibit low solubility and high volatility, limiting its use as a therapeutic agent. Colloidal drug delivery carrier present advantages such as drug release control, improved efficacy and physicochemical stability. Nanoemulsions (NE) are composed of vegetal, synthetic, or semisynthetic oils stabilized by surfactants. Nanocapsules (NC) consist of an oily or aqueous core surrounded by a polymeric wall. The aim of the present study was to develop and characterize NE and NC formulations containing TTO and evaluate the antimicrobial activity. NE-TTO and NC-TTO were prepared by spontaneous emulsification and nanoprecipitation method, respectively. Two pre-formulation study was performed for selected the composition the NE-TTO. The NE-TTO prepared with the surfactant Pluronic® F68 showed satisfactory results with a particle size of 146.76 ± 0.2 nm, polydispersity index of 0.171 ± 0.1 and zeta potential of -38.3 ± 0.1 mV. The two pre-formulation study indicated that the nanocapsules prepared from the Eudragit® RS100 polymer were more promising with particle size of 197 ± 0.5 , polydispersity index of 0.2 ± 0.1 and zeta potential of 33 ± 0.3 mV. The nanoemulsions and nanocapsules were stable at the two temperatures tested at end of 60 days and and instability index during the accelerated stability study. In the photostability study the NE remained stable for the first 5 days and the NC remained at the end of the experiment. Cytotoxicity of both systems and free TTO in RAW and HEK cells were also evaluated. The results showed no significant difference between free TTO and nanostructured systems. The effect of NE-TTO and NC-TTO on sepsis was evaluated by model cecal ligation puncture. A preventive effect of oxidative stress on the kidney and lung and reduction of inflammation in the peritoneal lavage and kidney was observed. In assessing the antimicrobial action of the systems, both significantly reduced bacterial growth. The determination of anti-herpetic activity against Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) was evaluated by a viral plaque reduction test. The cytotoxicity of NE-TTO and NC-TTO and free TTO was determined in Vero cells by Sulforhodamine assay for 48 h. NE-TTO and NC-TTOV showed a greater anti-herpetic effect against the HSV-1 virus compared to free TTO.

Keywords: Tea tree oil; *Melaleuca alternifolia*; nanotechnology-based delivery; nanoemulsions; nanocapsules; model cecal ligation puncture; antimicrobial activity, sepsis and HSV-1.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figure 1 TEM observations for blank nanoparticles (A), TTO-nanoemulsions (B) and TTO-nanocapsules (C) negatively stained with 0.5 % phosphotungstic acid.....	84
Figure 2 Particle size (A), polydispersity index (B), zeta potential (C) and pH (D) of nanoemulsion containing tea tree oil after 5, 15, 30 and 60 days of storage at 4 °C or 25°C (n=3).....	84
Figure 3 Particle size (A), polydispersity index (B), zeta potential (C) and pH (D) of nanocapsules containing tea tree oil after 5, 15, 30 and 60 days of storage at 4 °C or 25° (n=3).	85
Figure 4 Particle size (A), polydispersity index (B), zeta potential (C) and pH (D) of blank nanoparticles after 5 and 15 days of storage at 4 °C or 25°C (n=3).....	86
Figure 5 Particle size (A), polydispersity index (B), zeta potential (C) and pH (D) of nanoemulsion containing tea tree oil after 5, 15, 30 and 60 days of exposure to UVC (n=3).....	88
Figure 6 Particle size (A), polydispersity index (B), zeta potential (C) and pH (D) of nanocapsules containing tea tree oil after 5, 15, 30 and 60 days of exposure to UVC (n=3).....	89
Figure 7 Particle size (A), polydispersity index (B), zeta potential (C) and pH (D) of blank nanoparticles after 5, 15, 30 and 60 days of exposure to UVC (n=3).....	90
Figure 8 Light transmission profiles through the cell of samples, stored at 4 °C and 25 °C, subjected to centrifugation at. (A) NE-TTO at 4 °C; (B) NC-TTO at 4 °C; (C) NB at 4 °C; (D) NE-TTO at 25 °C; (E) NC-TTO at 25 °C; (F) NB at 25 °C.....	92
Figure 9 Effects of nanoparticles containing TTO on myeloperoxidase activity (MPO) in peritoneal lavage, lung and kidney by considering the <i>in vivo</i> model.....	95
Figure 10 Effects of nanoparticles containing TTO on the oxidation of sulfhydryl groups in the lung and kidneys by considering the <i>in vivo</i> CLP model.....	96
Figure 11 Effects of nanoparticles (with and without TTO) on bacterial growth in peritoneal lavage.....	97

APÊNDICE B

Figura 1 Efeitos dos sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> na atividade de mieloperoxidase no fígado e baço do modelo <i>in vivo</i> CLP.	150
Figura 2 Efeitos dos sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> sobre a atividade da enzima superóxido dismutase no fígado, baço, pulmão e rim	151
Figura 3 Efeitos dos sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> sobre a atividade da enzima catalase no lavado peritoneal, soro, baço, pulmão e rim no modelo <i>in vivo</i> de CLP.....	152
Figura 4 Efeitos dos sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> sobre a peroxidação lipídica no tecido hepático, pulmonar e renal do modelo <i>in vivo</i> CLP.....	154
Figura 5 Efeitos dos sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> sobre a oxidação proteica no fígado, pulmão, baço e rim do modelo <i>in vivo</i> CLP.	155
Figura 6 Efeitos dos sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> sobre a oxidação de grupamentos sulfidrila no fígado, pulmão, baço e rim do modelo <i>in vivo</i> CLP.....	156

APÊNDICE B

Figura 1 Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel (A) e do marcador químico γ -terpineno (B).....	159
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

ANEXO

Figura 1 Laudo técnico óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel.....	163
------------------------------------------------------------------------------------------	-----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Definições de síndrome de resposta inflamatória sistêmica, sepse, sepse grave, choque séptico e disfunção de múltiplos órgãos e sistemas.....131

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1 Nanoparticles of <i>Melaleuca alternifolia</i> presenting antimicrobial activity.....	45
------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

CAPÍTULO 2

Table 1 Precision of developed GC-MS method.....	79
Table 2 Results of mean droplet size, polydispersity index and zeta potential for TTO-nanoemulsions.....	81
Table 3 Results of mean particle size, polydispersity index and zeta potential for TTO-nanocapsules.....	82
Table 4 Cytotoxicity of NE-TTO, NC-TTO, BN and TTO free in RAW and HEK cells.....	94

CAPÍTULO 3

Tabela 1 Citotoxicidade em células Vero e atividade antiherpética contra HSV-1 de óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel Livre, NE-TTO e NC-TTO.....	115
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

APÊNDICE A

Table 1 Resultados obtidos no estudo de formulação para seleção do co-solvente para resposta tamanho de partícula índice de polidispersão e potencial zeta na seleção do co-solvente.....	148
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CG	Cromatografia gasosa
CLP	<i>Cecal ligation puncture model</i>
EUD	Eudragit [®] RS 100
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
ICH	<i>International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
NC	Nanocapsulas
NE	Nanoemulsão
PCL	Poli-ε-caprolactona
PDI	Índice de polidispersão
PLU	Pluronic [®] F68
SI	<i>Selectivity index</i>
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
TTO	<i>Tea tree oil</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	45
2 OBJETIVOS	47
2.1 Objetivo Geral	47
2.2 Objetivos Específicos	47
REFERÊNCIAS	49

<u>CAPÍTULO 1-</u> REVISÃO SOBRE AS MICRO E NANOPARTÍCULAS ANTIMICROBIANAS CARREGADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melaleuca alternifolia</i> CHEEL.....	55
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO 1	55
-------------------------------------------	-----------

<u>CAPÍTULO 2-</u> DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES E NANOCÁPSULAS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melaleuca alternifolia</i> CHEEL NO TRATAMENTO DA SEPSE.....	67
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO 2.....	67
------------------------------------------	-----------

<u>CAPÍTULO 3-</u> AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTI-HERPÉTICA DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melaleuca alternifolia</i> CHEEL.....	109
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

1 INTRODUÇÃO	109
---------------------------	------------

2 MÉTODOS.....	111
-----------------------	------------

2.1 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS.....	111
-------------------------------------------------------------------------	-----

2.2 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	111
------------------------------------------	-----

2.3 AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	112
-----------------------------------------------------	-----

2.3.1 Ensaio de redução do número de placas de lise	112
------------------------------------------------------------------	------------

2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICA.....	113
-------------------------------	-----

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	113
--------------------------------------	------------

3.1 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS.....	113
-------------------------------------------------------------------------	-----

3.2 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	113
3.3 ENSAIO DE REDUÇÃO DO NÚMERO DE PLACAS DE LISE	114
REFERÊNCIAS	117.
DISCUSSÃO GERAL	121
CONCLUSÕES	143
APÊNDICE A	147
1.1 ESTUDO DE FORMULAÇÃO COMPLEMENTAR	147
1.1.1 Seleção do co-solvente	147
APÊNDICE B.....	149
2.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE <i>IN VIVO</i>	149
2.1.1 Atividade de mieloperoxidase – MPO	149
2.1.2 Determinação do potencial antioxidante	150
2.1.3 Peroxidação lipídica	153
2.1.4 Carbonilação de proteínas	154
2.1.5 Oxidação de grupamentos sulfidrila	154
REFERÊNCIAS	155
APÊNDICE C.....	159
ANEXO.....	163

INTRODUÇÃO

Introdução geral - Objetivos

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais têm servido como uma fonte importante de fármacos durante séculos e cerca de metade dos produtos farmacêuticos em uso hoje em dia são derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2020). Dentre estes, os óleos voláteis vêm despertando interesse devido a seu potencial terapêutico (SHARIFI-RAD et al., 2017).

O gênero *Melaleuca*, pertencente à família Myrtaceae, inclui aproximadamente 100 espécies nativas da Austrália e Ilhas do Oceano Índico. Dentre as espécies deste gênero destaca-se a *Melaleuca alternifolia* Cheel, popularmente conhecida como árvore do chá. Esta planta ocorre principalmente em áreas de pântano, próximas de rios. Seu principal produto é um óleo volátil conhecido como óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel, que possui grande importância medicinal e é extraído da planta por hidrodestilação ou destilação por arraste de vapor d'água. Esta espécie é também cultivada em plantações para produzir o óleo volátil usado em produtos medicinais, agrícolas e de limpeza (OLIVEIRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2014; SHEPHERD et al., 2015)

Estudos fitoquímicos do óleo volátil extraído das folhas e ramos terminais da árvore revelaram uma grande diversidade de compostos, sendo majoritários os monoterpenos e álcoois. Dentre estes, destacam-se o terpinen-4-ol e o γ -terpineno (COMIN et al., 2016).

Estudos pré-clínicos demonstraram que o óleo possui um amplo espectro de atividades farmacológicas dentre as quais destacam-se a atividade antibacteriana (DRYDEN; DAILLY; CROUCH, 2004), antiviral (BRUN et al., 2018), antifúngica (HAMMER; CARSON; RILEY, 2003), anti-inflamatória (WONG et al., 2015) e antioxidante (ZHANG et al., 2018).

Apesar das inúmeras vantagens associadas a sua utilização, os óleos voláteis são muito sensíveis a fatores ambientais quando utilizados como tal (EL ASBAHANI et al., 2015). Como frequentemente ocorre com derivados obtidos de plantas, questões como a manutenção da atividade e a prevenção de possível toxicidade e de instabilidades, que podem ocorrer como consequência da composição complexa destas substâncias, tornam-se cruciais para a sua utilização (AJAZUDDIN; SARAF, 2010).

Aliado a isto, fazer com que o fármaco chegue inalterado e em quantidade suficiente ao local de ação é considerado um dos aspectos mais importantes para a efetividade do tratamento, e para isso é necessário liberar uma dose eficaz do fármaco no local de ação (TAYLOR, 2016)

O uso de sistemas coloidais como uma estratégia para melhorar o perfil biofarmacêutico de fármacos e moléculas biologicamente ativas vem sendo proposto com

sucesso devido às suas potencialidades terapêuticas. Moléculas biologicamente ativas podem ser incorporadas nestas nanoestruturas e, dessa forma, apresentarem modificações nas suas propriedades físicas, químicas e/ou farmacológicas no que se refere à biodisponibilidade, modulação da liberação, biodistribuição, estabilização de compostos lábeis e ao direcionamento a sítios específicos (KÜCHLER et al., 2010; WEBER; ZIMMER; PARDEIKE, 2014). No caso de substâncias ativas de origem vegetal, os sistemas coloidais conferem um grande número de vantagens, incluindo o aumento da solubilidade e biodisponibilidade, a proteção contra a toxicidade, o aumento da atividade farmacológica, o aumento da estabilidade, liberação sustentada, a proteção contra a degradação física e química, etc. (AJAZUDDIN; SARAF, 2010) Entre os sistemas que se caracterizam por serem capazes de melhorar as características de sistemas farmacêuticos, destacam-se as nanoemulsões e nanocápsulas. Nanoemulsões são sistemas emulsionados nos quais gotículas oleosas de tamanho nanométrico estão dispersas em uma fase contínua externa, estabilizadas por tensoativos. As nanocápsulas são sistemas reservatório nos quais é possível identificar um núcleo líquido oleoso ou aquoso rodeado por material sólido (invólucro polimérico).

Assim, a encapsulação em sistemas de administração nanoestruturados pode ser considerada uma alternativa promissora para contornar os problemas associados com a utilização de óleos voláteis como fonte de novos medicamentos. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel e com isso obter um produto intermediário estável com potencial para ser utilizado no desenvolvimento de um medicamento fitoterápico antimicrobiano com enfoque no tratamento da sepse e herpes labial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel para obtenção de um produto intermediário estável com potencial para ser utilizado no desenvolvimento de um medicamento fitoterápico antimicrobiano com enfoque no tratamento da sepse e herpes labial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar metodologia analítica por cromatografia gasosa para quantificação do marcador químico γ -terpineno presente no óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*
- Preparar nanoemulsões e nanocápsulas a partir do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*
- Caracterizar os sistemas nanoestruturados quanto à morfologia, tamanho de partícula, potencial zeta e polidispersão
- Determinar a estabilidade dos nanossistemas frente a diferentes condições de estocagem
- Avaliar e comparar a citotoxicidade *in vitro* dos sistemas nanoestruturados
- Avaliar a atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante *in vivo* dos nanossistemas no tratamento da sepse
- Avaliar a atividade *in vitro* anti-herpética dos nanossistemas

3 REFERÊNCIAS

- AJAZUDDIN; SARAF, S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 680–689, out. 2010.
- COMIN, V. M. et al. Influence of *Melaleuca alternifolia* oil nanoparticles on aspects of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Microbial Pathogenesis**, v. 93, p. 120–125, abr. 2016.
- DRYDEN, M. .; DAILLY, S.; CROUCH, M. A randomized, controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization. **Journal of Hospital Infection**, v. 56, n. 4, p. 283–286, abr. 2004.
- EL ASBAHANI, A. et al. Essential oils: from extraction to encapsulation. **International journal of pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–43, 10 abr. 2015.
- GAROZZO, A. et al. Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on Influenza virus A/PR/8: Study on the mechanism of action. **Antiviral Research**, v. 89, n. 1, p. 83–88, jan. 2011.
- HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of applied microbiology**, v. 95, n. 4, p. 853–60, jun 2003.
- KÜCHLER, S. et al. SLN for topical application in skin diseases--characterization of drug-carrier and carrier-target interactions. **International journal of pharmaceutics**, v. 390, n. 2, p. 225–33, mai. 2010.
- LOW, P. et al. Immunomodulatory activity of *Melaleuca alternifolia* concentrate (MAC): Inhibition of LPS-induced NF-κB activation and cytokine production in myeloid cell lines. **International Immunopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 257–264, jan. 2015.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades. **Journal of Natural Products American Chemical Society**, v 12, n 3, p, 127-135, mar. 2020.
- OLIVEIRA, A. C. M. et al. Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 492–499, 2011.
- PEREIRA, T. S. et al. *In vitro* genotoxicity of *Melaleuca alternifolia* essential oil in human lymphocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 2, p. 852–857, fev. 2014.
- SHEPHERD, M. et al. Ecotype variation in early growth, coppicing, and shoot architecture of tea tree (*Melaleuca alternifolia*). **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 844–856, dez. 2015.
- WEBER, S.; ZIMMER, A.; PARDEIKE, J. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: A review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 1, p. 7–22, jan. 2014.
- WONG, Y. F. et al. Enantiomeric distribution of selected terpenes for authenticity assessment of Australian *Melaleuca alternifolia* oil. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 475–483, maio 2015.
- ZHANG, X. et al. *In Vitro* Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–8, maio 2018.

CAPÍTULO 1

*A short review on the antimicrobial micro-and nanoparticles loaded with
Melaleuca alternifolia essential oil*

INTRODUÇÃO

Este capítulo apresenta uma revisão dos sistemas nano e microparticulados contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em forma de artigo. O manuscrito foi publicado na revista *Journal of Drug Delivery Science and Technology*.

BATTISTI, M. A.; CAON, T.; CAMPOS, A.M. A Short review on the antimicrobial micro- and nanoparticles loaded with *Melaleuca alternifolia* essential oil. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Volume 63 (Cover date: June 2021) Article 102283 .

Link para consulta:

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102283>



Review article

A short review on the antimicrobial micro- and nanoparticles loaded with *Melaleuca alternifolia* essential oil

Mariana Alves Battisti, Thiago Caon, Angela Machado de Campos^{*}

Programa de Pós-Graduação Em Farmácia (PGFAR), Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Melaleuca alternifolia
Tea tree oil
Antimicrobial activity
Nanoparticles
Microparticles

ABSTRACT

Although an antiviral, antibacterial, antimycobacterial and antifungal potential have been reported for the tea tree oil (TTO), low solubility, high volatility and oil oxidation may limit the formulation development step. In this context, micro- and nanoparticles could be considered to avoid these chemical instability problems. Furthermore, an improved efficacy could be found due to a greater surface area, which would increase the interactions between TTO and microorganisms. Overall, TTO may be incorporated into micro- or nanoparticles or may be included as a constituent of oily phase. Microparticles would be preferentially selected if a long-term or sustained drug release is required whereas nanoparticles are more advantageous in terms of cell internalization or effectiveness. TTO-based systems have also been combined with Ag nanoparticles to further enhance the antimicrobial efficacy through a synergistic action and to reduce or avoid microbial resistance problems. These combined systems have been particularly considered to avoid the formation of bacterial biofilms, which often include more resistant microorganisms. In view of the advantages that can be obtained with the reduction of the particle size, this review aimed to report the various nano- and microparticulate systems already considered as a vehicle for the TTO in order to guide new researches with this agent.

1. Introduction

Essential oils (OE) are oily liquids naturally produced by aromatic plants as secondary metabolites, which represent complex and fragile hydrophobic mixtures characterized by a strong odor. OEs can be extracted from different plant parts such as flowers, buds, stems, leaves, seeds, branches, roots, fruits and bark [1,2].

In the last decade, OEs have attracted considerable attention in pharmaceutical, food and cosmetic fields due to the various biological activities. These broad-spectrum biological activities can be attributed to the complexity and variability of their chemical composition, which mostly include monoterpenes and sesquiterpenes [3].

The essential oil of the tea tree (TTO), extracted by steam distillation from leaves of *Melaleuca alternifolia*, a native Australian plant, consists of a diversity of volatile substances, mainly monoterpenes, sesquiterpenes and their corresponding alcohols, such as terpinen-4-ol, γ - and α -terpinen, α -terpineol and 1,8 cineole. The composition of TTO is regulated by an international standard (ISO 4730:2017), which mentions the maximum and minimum concentration limits for 14 oil constituents [4]. The quality of the TTO is associated with its chemical composition, and

it should present a minimum content of 30% w/w terpinen-4-ol and a maximum content of 15% w/w 1,8-cineol, since the latter shows irritating behavior [5]. TTO has been the subject of various studies, mainly due to its therapeutic potential [6,7]. It is popularly used as a topical antifungal and antibacterial agent. Antimicrobial [8–10], anti-inflammatory [11], antifungal [12–16], antiviral [17–19] and antiprotozoal [20,21] activity has been reported for the oil and individual constituents. Despite the promising results in terms of activity, one of the main limitations is related to the toxicity of the oil and its isolated constituents. In the literature, sensitization and dermatitis from contact with allergens are reported [22]. In addition, this oil can result in poisoning, if ingested, even in reduced doses [5]. An extensive and detailed review of phytochemistry, pharmacological applications, safety and toxicity have been reported by Yadav et al. (2017) and Shah & Baghel (2017) [23].

TTO constituents present a tendency to degrade easily when exposed to light, heat, air and humidity, besides a possible susceptibility to hydrolysis and oxidation reactions [15,24]. These characteristics, which result in low bioavailability, combined with the report of oral and topical toxicity for both oil and isolated constituents, are some of the

^{*} Corresponding author.

E-mail address: angela.campos@ufsc.br (A. Machado de Campos).

main challenges for the use of TTO as bioactive in the herbal medicine. In this sense, novel technological approaches such as systems based on micro- and nanotechnology have been proposed. These systems are typically based on polymers, lipid materials or their combination [25, 26]. The main types of micro-nanoparticulate drug delivery systems are presented in Table 1. Advantages such as improved solubility, bioavailability and pharmacological activity, protection against toxicity, sustained release and protection from physical and chemical degradation may be achieved by using these systems. In view of these advantages, micro- and nanoscale drug delivery systems used to improve the therapeutic potential of TTO were considered in this review.

2. Polymeric nanoparticles

Polymeric nanoparticles (PNPs) have been extensively studied as drug delivery systems in recent years due to their interesting properties attributed to their small size [26,36]. PNPs are defined as solid colloidal particles sized between 10 and 100 nm. They are typically prepared from physiological, biocompatible and, if possible, biodegradable polymers. Some polymer examples include the poly (lactic acid) (PLA), poly (D, L-lactic-co-glycolic) acid (PLGA) and poly-ε-caprolactone (PCL), which are already well-accepted by the FDA [36]. Depending on the obtained structure, polymeric nanoparticles may be classified as (1) nanocapsules, a vesicular structure with a generally oily core that contains the drug covered by a polymeric coating and (2) nanospheres or matrix system, where the active compounds and the polymer are co-dispersed uniformly [37,38]. Nanoparticles present important technological advantages, such as the possibility of incorporating both hydrophilic and hydrophobic compounds, increased solubility, protection of the encapsulated active substance against degradation, and biological advantages such as optimization of distribution, controlled/sustained release, reduction of adverse effects and, in the case of food products, improvement in organoleptic characteristics [38–40]. Several studies in the literature report the inclusion of essential oils in polymeric nanoparticles and in other types of nanostructured systems [41], mainly aiming to protect them from environmental factors that can cause active degradation and the loss of bioactive compounds by volatilization or degradation. For the TTO, the encapsulation in these systems could also provide safer administration, with a reduced side effect profile. Despite the various advantages, polymeric nanoparticles present some limitations as (1) cost of the materials/polymers used in the formulation; (2) the fate of polymer matrix and its effect on the environment and (3) toxic degradation and toxic monomers aggregation [42].

Flores et al. (2011), in a comparative study, developed nanocapsules (NC), nanoemulsions (NE) and emulsions (E) using TTO as an oily phase in order to increase the stability of the oil, prevents its volatilization as well as oxidation or degradation reactions of its components. The intensity of the odor characteristic of TTO, one of the parameters that limit the application in oral and topical preparations, was decreased in relation to pure oil (NC < NE < E < pure oil). NCs were significantly more efficient than NE in protecting the oil, which was attributed to the polymeric coating of the NCs, and both systems provided greater protection to the oil than the emulsions [43].

The antifungal potential of these formulations were also evaluated for this research team in an *in vitro* model of onychomycosis caused by *Tricophyton rubrum* [33]. NC and NE induced a significant reduction in the number of infected cells after the first week treatment. NC were more efficient in the reduction of the fungal growth. This result was considered very promising once the treatment of onychomycosis requires a long-term systemic therapy, is characterized by various adverse effects, presents high cost and possible interactions with other drugs, and usually its success rate is low. The topical therapies available are often ineffective due to the low permeability of the nail plate, so a topical system able to adhere and permeate the nail, and additionally providing a prolonged effect, is of great interest. NC and NE were also efficient in inhibiting the growth of *Candida albicans* [37]. NC also showed a

superior performance since it was able to maintain this effect for longer. These data corroborate previous findings that report the greater surface area provided by the nanocapsules, which would facilitate the interaction between the TTO and the fungal membrane [44].

3. LIPID-BASED nanoparticles

Lipid nanoparticles may be prepared from different types of lipids such as natural (egg yolk lecithin) and synthetic phospholipids [45]. Lipid-based nanoparticles have been widely used in drug administration due to many advantages such as protection against chemical and enzymatic degradation, gradual release of molecules from the lipid matrix, reduction of adverse side effects and chronic toxicity of drug delivery systems [46–50].

3.1. Solid lipid nanoparticles (SLN)

SLN are prepared from biocompatible excipients, presenting no or low acute and chronic toxicity. The solid matrix allows a controlled release of the encapsulated molecules and protects them from degradation [47,51]. In contrast, drug expulsion during the storage condition due to the polymorphic transition and limited loading capacity for hydrophilic drugs may be observed for these systems [52].

Baldissera et al. (2014) investigated the trypanocidal action of TTO after its incorporation into SLN. Both pure TTO and nanoparticles were able to reduce the growth of *Trypanosoma evansi* strains. TTO nanoparticles provided a greater trypanocidal action than pure TTO considering that an inhibitory effect on the parasite was observed by using lower TTO concentrations. These findings were associated with a greater interaction between nanoparticles and the parasite membrane.

Madalosso et al. (2017) evaluated the *in vitro* and *in vivo* effect of TTO-SLNs against nematodes, mainly the species of the genus *Meloidogyne* sp. The *in vitro* and *in vivo* results showed a nematocidal potential of TTO-SLN in its juvenile stage and on the eggs present in the root and soil. The nematocidal activity was related to the large surface area of SLN, which result in greater chemical and biological reactivity and catalytic behavior when compared to free TTO. In addition to high activity of TTO-SLN against nematodes, these systems would reduce environmental damages once highly toxicity products are usually applied to eliminate these worms.

The antimicrobial activity of TTO-SLNs have been also tested clinically in healthy human volunteers. Ebling et al. (2018), for example, investigated the antimicrobial activity of SLN-TTO on dental biofilms formed *in situ*. Patients received an oral device in that different samples were randomly administered: saline (negative control), chlorhexidine (positive control), TTO and SLN-TTO. A significant antimicrobial effect of the SLN-TTO in relation to the positive control group was found. The authors concluded that the therapeutic application of the proposed SLNs in the treatment and prevention of polymicrobial oral biofilms is promising.

3.2. Nanostructure lipid carrier (NLC)

NLC are composed of solid lipids combined with liquid lipid and stabilized by surfactants [53]. NLC were developed to overcome some limitations of SLN. NLCs present high drug loading capacity due to the imperfect crystal structure and could prevent drug expulsion by avoiding lipid crystallization during the manufacturing and storage. NLCs may also improve drug solubility in lipid matrix and show more controllable release profiles in comparison to SLNs [49,52,54]. The main advantage of this second-generation nanoparticles is to increase the loading capacity. Due the mixing of different types of lipids, NLC presents a less ordered lipid matrix, with more space to accommodate active compounds. These systems may be composed of physiological and biodegradable lipids, which are generally recognized as safe (GRAS) [50,55,56]. NLCs provide high encapsulation efficiency for both

Table 1
Nanoparticles of *Melaleuca alternifolia* presenting antimicrobial activity.

Nanoparticle constitution (lipid and/or polymer type)	Preparation technique	Particle size and zeta potential	Tested microorganisms	Assay	Main outcome	Reference
Nanoemulsions						
TTO/cremophor EL	High-pressure homogenization	12.5 nm; -20.7 mV	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Acinetobacter baumannii</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> .	Minimal inhibitory concentration (MIC)	TTO-loaded nanoparticles showed MIC values of 1.76, 3.52, 7.03, 3.52, and 3.52 mg TTO mL ⁻¹ for <i>E. coli</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , and <i>C. albicans</i> , respectively. Nanoparticles also resulted in a higher <i>in vivo</i> activity than fluconazole against the fungal pneumonia and showed a similar <i>in vivo</i> antibacterial activity to penicillin even at a higher dose of the latter.	[27]
Terpene mixture extracted from <i>Melaleuca Alternifolia</i>	High pressure homogenization	74.4 and 174.8 nm	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> .	Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)	After TTO nanoencapsulation, MIC and MBC values were reduced by 10- and 2-times, respectively, for <i>S. cerevisiae</i> . For <i>L. delbrueckii</i> , a reduction of 2.5-times in MBC values was found while the MIC values were maintained or increased 2-times depending on nanoemulsion type. Interestingly, TTO-nanoemulsion did not significantly reduce the MIC and MBC values for <i>E. coli</i> , regardless of the nanoemulsion system.	[28]
TTO	Spontaneous emulsification	173–305.7 nm; -19.2 to -24.8 mV	<i>Propionibacterium acnes</i>	Agar diffusion test	The ability to inhibit the growth of <i>P. acnes</i> was dependent on the concentration of TTO. Nanoemulsion gels formulated with 5, 7, and 9% of TTO increased mean inhibition zone values in 3.5, 3.8 and 4.0-times, respectively, compared to the negative control (distilled water). Although nanoemulsion gels showed to be more active than negative control, they were less active than the pure oil.	[29]
Ag ⁺ -TTO	Aqueous titration method	17.7 nm; -29.24 mV	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Minimum inhibitory concentration	TTO nanoemulsions showed MIC values 200-times higher than Ag NPs for both <i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i> . A synergistic antibacterial effect between Ag NPs and TTO was observed, which is particularly relevant for treatment of resistant pathogens. TTO NE + Ag NPs, in turn, showed a considerable increase in antimicrobial activity. MIC values of Ag NPs + NE-TTO were 3–6 and 2 to 4-times lower for <i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i> , respectively, than individual nanosystems.	[30]
Nanostructure lipid carrier						
Acetyl palmitate	High pressure homogenization	150.2 nm; -8.69 mV.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacteria mobility test in swimming agar Antibiofilm assay and adhesion test in buccal epithelial cells	TTO oil did not inhibit the motility of bacteria while TTO nanoparticles inhibited at approximately 62.5%. TTO and TTO-NLC reduced in a similar way the number of adherent bacteria to epithelial cells and biofilm formation.	[31]
Solid Lipid Nanoparticles						
Cetyl palmitate	High pressure homogenization	287 nm; -14.2 mV.	<i>Trypanosoma evansi</i>	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> (rat model) trypanocidal activity	The <i>in vitro</i> trypanocidal activity of TTO and SLN-TTO against <i>T. evansi</i> trypomastigotes was time and concentration-dependent. TTO nanocapsules demonstrated apparently a faster trypanocidal effect than the pure oil. TTO-nanocapsules did not increase the longevity of mice infected with <i>T. evansi</i> nor did they show curative efficacy compared to the positive control (not treated and infected mice).	[20]
Cetyl palmitate	High pressure homogenization	158 nm; -8.69 mV.	<i>Meloidogyne sp.</i>	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> nematocidal activity	After the nanoencapsulation of TTO, the <i>in vitro</i> nematocidal activity of oil was extended. Considering 5% of TTO, pure	[32]

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Nanoparticle constitution (lipid and/or polymer type)	Preparation technique	Particle size and zeta potential	Tested microorganisms	Assay	Main outcome	Reference
Nanoemulsions					oil resulted in 100% mortality of <i>Meloidogyne sp.</i> at 20 h of assay while TTO nanoparticle showed a complete nematocidal activity at 72 h. Overall, the treatment with pure oil of TTO nanoparticle (5, 10 and 15 mg/mL) resulted in a number of death of nematodes in soil/roots and number of eggs in soil/roots close to positive control (abamectin).	
Polymeric nanoparticles						
Poly(ϵ -caprolactone)	Interfacial deposition of preformed polymer	160–220 nm	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>In vitro</i> models of dermatophyte nail infection	In assays with nail powder infected with <i>T. rubrum</i> , the plate counts were 2.37, 1.45 and 1.0 log CFU mL ⁻¹ for emulsion, TTO-NE and TTO-NC, respectively. The diameters of fungal colonies cultivated on nail fragments were 2.88, 14.59, 40.98 and 38.72 for TTO-NC, TTO-NE, emulsion and untreated nail, respectively. Based on these results, TTO-NC were identified as more promising delivery systems.	[33]
Poly(ϵ -caprolactone)	Interfacial deposition of preformed polymer	200 nm	<i>Candida albicans</i>	<i>In vitro</i> antifungal activity (determination of CFU/mL)	Both TTO-NC and TTO-NE significantly reduced the growth of <i>C. albicans</i> compared control group (TTO-free nanoparticles) at initial intervals; however, TTO-NC maintained the antimicrobial effect for a longer period (until 72 h).	[34]
Liposomes						
Phosphatidylcholine/cholesterol	Reverse-phase evaporation method	–	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Candida albicans</i>	Minimum lethal concentration Fractional lethal concentration index Time kill analysis	these MLC values (Table 1) are substantially lower (TTO) or unaffected (Ag ⁺) compared to the previously reported MLC results of the free agents against these MLC values (Table 1) are substantially lower (TTO) or unaffected (Ag ⁺) compared to the previously reported MLC results of the free agents against these MLC values (Table 1) are substantially lower (TTO) or unaffected (Ag ⁺) compared to the previously reported MLC results of the free agents against Liposomes containing TTO in combination with Ag ⁺ showed to be more active than individual systems. For this combination, both <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> presented a similar effective concentration, which was 5-times lower than that of <i>P. aeruginosa</i> (more resistant microorganism). The fractional lethal concentration index demonstrated an indifferent effect against <i>C. albicans</i> for the combination of liposomal agents (with TTO and Ag ⁺) whereas a synergistic effect was identified for the other two microorganisms. In time kill analysis, <i>P. aeruginosa</i> showed a faster decrease in microbial load than <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> (4 and 3-times, respectively).	[35]

lipophilic and hydrophilic drugs [57], which represents a relevant advantageous when compared to previous system. On the other hand, lack of sufficient preclinical and clinical studies with NLCs is observed [58].

Flores et al. (2017) developed lipid nanoparticles containing thioconazole and TTO for the treatment of infections caused by dermatophyte fungi. Although these systems had been classified as SLN, they were prepared from mango butter and TTO, i.e., solid and liquid lipid,

respectively. Both nanoparticle systems containing thioconazole were active against *Candida albicans* in agar diffusion assays. Next, the systems were incorporated into hydrogels for topical applications. Release studies showed that the presence of TTO led a longer release control. Permeation studies on porcine skin demonstrated that hydrogels containing nanoparticles presented a preferential retention of thioconazole in the stratum corneum whereas the hydrogel containing the non-

encapsulated tioconazole as mostly detected in the epidermis and dermis. Based on these findings, the authors concluded that the association of lipid nanoparticles of thioconazole to TTO targets the drug to the stratum corneum, suggesting that the systems are potential candidates for the treatment of cutaneous infections [59].

Casarin et al. (2019) investigated the antibiofilm and anti-inflammatory effect of NLC-TTO in a crossover clinical trial. NLC-TTO or chlorhexidine gluconate (control) were applied in the oral cavity of 60 participants selected randomly. On day 7, the participants received a questionnaire addressing taste of the product and periodontal parameters were also evaluated. Biofilms were investigated using the Quigley & Hein Plaque Index (QHPI). A similar anti-inflammatory effect of chlorhexidine and NLC-TTO was found, which was associated with the nanometric size of the particles. This reduced particle size would contribute to a high penetration of TTO into the polymer matrix of the biofilm, improving both antimicrobial and anti-inflammatory effects. On the other hand, chlorhexidine was more tasty and displayed to greater control of the biofilm than NLC-TTO. These findings were attributed to the low concentration of TTO applied. The authors suggest that additional clinical trials testing different protocols and concentrations of TTO should be performed to evaluate the relevance of this product.

Comin et al. (2016) evaluated the antibiofilm and antimicrobial activity of NLC-TTO against *Pseudomonas aeruginosa* and also the effect of these systems on adhesion of *P. aeruginosa* in buccal epithelial cells. NLC-TTO reduced both bacterial adhesion on cells and biofilm formation in a concentration-dependent way. The authors have not discussed if NLC-TTO is more efficient than pure oil; however, a similar effect seems to have been observed. Therefore, the NLC-TTO showed to be a viable alternative against formed biofilm microorganisms. Information on the stability of the NLC-TTO was not presented by the authors given that low zeta potential was found for the particles after dilution.

Souza et al. (2017), in turn, evaluated the effect of NLC-TTO on hepatic oxidative damage experimentally induced with *Pseudomonas aeruginosa* in a silver catfish model (*Rhamdia quelen*). After the intramuscular injection of this bacteria, increased levels of protein carbonylation, thiobarbituric acid relative substances and advanced oxidation protein product were found in catfish liver samples. The excessive production of free radicals, mainly reactive oxygen species, increases the damages to macromolecules such as lipid and proteins. After oxidation of lipid, the formation of malondialdehyde is observed, which are accumulated in tissues such as hepatocytes. For proteins, free radicals can lead to functional and progressive loss of metabolic or enzymatic properties. The prophylactic treatment with 50 $\mu\text{L/L}$ of NLC-TTO, 1 h before the inoculation of *P. aeruginosa*, during 7 days, prevented these events, demonstrating a key role of this system in the treatment of hepatic injuries caused by bacterias. The hepatoprotective effect of NLC-TTO was attributed to both antioxidant and antibacterial activity of the oil [60].

4. Nanoemulsions

Nanoemulsions (NEs) were introduced for parenteral nutrition purposes during the 1950s and, more recently, they have been used as drug delivery systems [61]. Nanoemulsions are biphasic systems, consisting of vegetable, synthetic or semi-synthetic oils and an aqueous phase, which are stabilized by the presence of a surfactant, presenting nanometric-sized drops, typically between 50 and 200 nm [62,63,64]. According to the structure, they can be classified as oil-in-water (O/W) if the oil phase is homogeneously dispersed in an aqueous phase, or water-in-oil (W/O), where the water droplets are dispersed in the continuous oil phase [65]. O/W nanoemulsions are most often used as a vehicle for essential oils, which normally constitute the internal or dispersed phase of the emulsion. The main characteristic of NEs is their great stability of droplet suspension; however, they are subject to some instability phenomena after long-term storage such as (i) flocculation

followed mostly by coalescence and (ii) Ostwald ripening [66]. These phenomena may directly impact the *in vivo* performance of the formulations due to the formation of larger and more heterogeneous droplets, with a reduced surface area and, consequently, higher polydispersity index [67–69].

Li et al. (2016) reported the effect of NE-TTO for the treatment of bacterial and fungal pneumonia. The TTO nanoemulsions showed a significant *in vitro* antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *In vivo*, inhaled NE-TTO rapidly achieved lung tissue and markedly decreased lung injury and inflammation in rats infected with Gram positive, Gram negative bacteria and fungi. Low NE-TTO doses showed a greater *in vivo* antifungal efficacy than fluconazole, providing a reduction of lung injury and pro-inflammatory mediators, high microbial clearance as well as a block in the recruitment of leukocytes. For *in vivo* bacterial pneumonia, NE-TTO showed slightly lower therapeutic efficacy than penicillin in a much lower dose; however, these nanoparticles would be more efficient in cases where bacterial resistance is found. The nanoscale size of the droplets, which result in an increased surface area, probably led to an increased interaction between NE-TTO and microorganisms, explaining these findings.

NE-TTO were incorporated into a gel aiming to inhibit the growth of *Propionibacterium acne*. The inhibition zone increased with the TTO concentration (a concentration-dependent effect) and the antimicrobial effect was attributed to presence of terpinen-4-ol. Mean inhibition zones of 28.33, 30.33, and 31.67 mm were obtained at 5, 7 and 9% of TTO, respectively. These values were approximately twice the value obtained for positive control, which was a benzoyl peroxide gel at 5%. The NEs incorporated into the gel showed to be stable for 8 weeks at 4 °C and at room temperature after cycling test and centrifugation test, suggesting that this formulation is promising for acne [29].

Donsi et al. (2011) investigated the potential of NE containing a terpene mixture of TTO and α -limonene as natural preservatives to improve safety and quality of fruit juices. The antimicrobial effect of NEs (minimal bactericidal concentration - MBC and minimum inhibitory concentration - MIC) was investigated against *Lactobacillus delbrueckii*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, which represent three different classes of foodborne pathogens. The effect of nanoencapsulation of TTO terpenes on the antimicrobial activity varied depending on the target microorganism. For *S. cerevisiae*, the MIC and MBC values were reduced after encapsulation. For *L. delbrueckii*, the nanoencapsulation caused a reduction of the MBC values while the MIC values were maintained. For *E. coli*, these parameters were not reduced after encapsulation. Improved transport mechanisms across the cell membrane of target microorganisms would explain the high antimicrobial activity of NEs in some situations. The efficacy of these systems was also tested in orange and pear juices. Low concentrations of terpene-based NEs were able to delay the microbial growth or completely inactivate microorganisms when this concentration was increased in 5-fold.

As an approach to enhance the antimicrobial effect of TTO and avoid microbial resistance problems, Najafi-Taher et al. (2017) combined this essential oil with Ag nanoparticles (Ag-NPs) in a same system. NE-TTO loaded with Ag-NPs in the aqueous phase were tested against both standard and resistant strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In bacterial disc diffusion assays, the proposed combination showed to be more active than tetracycline against resistant strains. At the highest non-toxic concentration for human cells (14 $\mu\text{g/mL}$), NE-TTO + Ag-NPs showed significant antibacterial effect, i.e., 95 and 90% of bacterial death for standard and tetracycline-resistant bacteria, respectively. The addition of Ag-NP to NE-TTO resulted in a synergistic effect against *E. coli* and an additive effect against *S. aureus*. These findings may be explained based on different cell wall structure of Gram-positive and Gram-negative bacteria. The authors concluded that the system prepared with NE-TTO and Ag-NP may be a promising candidate against the threat of antibacterial resistance.

5. Liposomes

Liposomes were discovered by Bangham and Horne in the 1960s and have been used successfully as a drug delivery system in both cosmetic and pharmaceutical industries [70–72] [70–72] [70–72]. They consist of one or more lipid bilayers surrounding aqueous units, where the polar head groups are oriented in the pathway of the interior and exterior aqueous phases. These systems may be formed by a self-aggregation mechanism of natural or synthetic phospholipids and cholesterol [73, 74] and are classified into large unilamellar vesicle, small unilamellar vesicles and multilamellar vesicles [70]. These vesicles are considered biocompatible, biodegradable, have low toxicity and allow the incorporation of both hydrophilic and hydrophobic drugs, which may be trapped in the aqueous core, at the interface or in the phospholipid bilayer [73–77] [73–77] [73–77]. Among the advantages of using liposomes for encapsulating essential oils are protection against oxidation and volatilization and improved bioavailability by increasing water solubility, besides the ability to vectorize them in specific sites. In contrast, some disadvantages may be found such as stability issues, batch to batch reproducibility, sterilization method, low drug entrapment and particle size control as well as rapid elimination from the blood and capture by the reticuloendothelial system [78,79].

Low et al. (2013) investigated the *in vitro* antimicrobial efficacy of liposomes containing TTO and Ag⁺ against pathogens involved in chronic wound infections. In addition to a known antimicrobial activity, both therapeutic agents offer some benefits in wound healing. TTO provides the suppression of monocyte-mediated inflammation while Ag⁺ inhibits collagenase activity. In view of the benefits that would be achieved by the combination of TTO and Ag⁺, and considering the problem of microbial resistance to conventional antibiotics, the authors evaluated the antimicrobial effect of this combination against *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* after their encapsulation in liposomes. *P. aeruginosa* was least sensitive to TTO whereas *S. aureus* showed highest resistance to Ag⁺ treatment. When Ag⁺ and TTO are used in combination, lower amount of each agent was required to achieve increased antimicrobial activity. Both TTO and Ag⁺ would act by disrupting the membrane stability and, after encapsulation, internal cell processes could be affected. Authors present evidences of a sustained release for the system, which is relevant in cases of bacterial resistance; however, experimental data have not been obtained [80].

6. Microparticles

The application of microparticles as delivery vehicles has been considered in several industrial areas [81]. Microparticles are drug delivery system with size larger than 1–1000 µm [82]. These systems allow the release of the encapsulated agent at a constant plasmatic level, offer easy and non-invasive administration through injection or ingestion [83, 84]. Both hydrophilic and hydrophobic drug categories have been successfully encapsulated in these systems [85]. On the other hand, process conditions as changes in temperature, pH, solvent addition and evaporation/agitation may affect the stability of encapsulated material. The environmental impact of the degradation products of the polymer matrix produced in response to heat, hydrolysis, oxidation, solar radiation or biological agent is also not well known [86].

Based on these, Pérez-Limiñana et al. (2014) developed TTO microparticles as a natural biocide for footwear applications. TTO would play a role eliminating the microorganisms responsible for unpleasant odors. Gelatine-carboxymethylcellulose (G/C) were prepared by the complex coacervation method and then applied to footwear materials (leather and textile). The ration G/C impacted on coacervate formation and also on the encapsulation efficiency of essential oil. TTO would be released from microcapsules through friction stresses of the foot inside the shoe. A relevant point raised by the authors is that G/C microcapsules should be included in the final step of the shoemaking process and

in less-stressed parts of the shoes due to the instability thermal and mechanical of these systems [87].

7. Final considerations

The irrational use of antimicrobials, which includes prescription of incorrect doses, self-medication and treatment of non-bacterial illness has contributed to the growth of cases of microbial resistance. In this context, the discovery of new therapeutic agents is essential and natural compounds have been a promising option due to low toxicity. In fact, TTO have demonstrated to be effective against several resistant microorganisms (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*) in studies presented here. Despite high antimicrobial action of this essential oil, it is characterized by high volatility, low solubility and oil oxidation. In this context, the micro- and nanoencapsulation represents a useful approach to overcome these limitations. Moreover, as reported above, the increased surface area of these vehicles facilitates the interaction with microorganisms or biological membranes, improving the efficacy. Wound infections as well as biofilms are often colonized by bacteria resistant to conventional antibiotics and micro- and nanoparticles of TTO seem to be promising in this context. The activity of TTO-based systems in avoiding the formation of biofilms, for example, has already been confirmed clinically. Combinations of TTO with other classic antibiotics were also reported, which led to a reduction in the drug concentration and thus drug-related adverse effects. In the same way, innovative systems based on Ag⁺ have been combined with TTO in nanoparticulate systems to enhance the antimicrobial effect. Unlike the TTO, Ag⁺ nanoparticles did not show to be very effective against *S. aureus* strains; exemplifying that antimicrobials present a selective action mechanism. Therefore, a complete screening of antimicrobial activity for the TTO should be performed, considering appropriate experimental controls (drugs with well-reported antimicrobial activity), in an attempt to verify which combinations of therapeutic agents could be more effective against resistant microorganisms. In this same way, studies comparing different nanoparticle types should be performed. NEs usually result in greater encapsulation efficiency of active ingredients and interaction with lipid membranes of microorganisms; however, they are more physically and chemically unstable systems and do not reduce the odor of TTO with the same intensity as nanocapsules. Micro- and nanocapsules, in turn, are more stable (polymeric coating protects TTO) and provide greater control in TTO release, which is a critical aspect to extend the duration of oil action and thus reduce or even avoid microbial resistance problems. Once the odor characteristic of TTO may limit oral applications, nanoparticles able to improve this aspect more efficiently (e.g. nanocapsules) should be prioritized here. Despite these advantages/disadvantages inherent to each type of nanoparticle, it is important to keep in mind that these characteristics/properties can be modified after inclusion in other vehicles (e.g. gels, creams).

Although this review has considered only antimicrobial studies of TTO micro- and nanoparticles, this oil present a extensive number of other biological activities to further improve its performance in cases of infections. The anti-inflammatory activity of TTO, for example, may be useful in *P. acnes* infection. Additional randomized and controlled trials are needed to confirm the benefits of the systems presented here. The relationship between zeta potential of micro and nanoparticles and interaction with the microorganisms also need to be more studied.

Author contributions

MB searched the literature in different databases, collected the main data, and drafted the first version of the manuscript. All authors suggested the outline of the article, and participated of the article selection used in this review. All authors participated in the writing, editing and revising of the final version of manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

Battisti MA would like to thank CAPES / MEC for student scholarship.

References

- M. Rai, P. Paralikar, P. Jogee, G. Agarkar, A.P. Ingle, M. Derita, S. Zacchino, Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: emerging trends and future perspectives, *Int. J. Pharm.* 519 (2017) 67–78, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.013>.
- P. Low, A.M. Clark, T.C. Chou, T.C. Chang, M. Reynolds, S.J. Ralph, Immunomodulatory activity of Melaleuca alternifolia concentrate (MAC): inhibition of LPS-induced NF- κ B activation and cytokine production in myeloid cell lines, *Int. Immunopharm.* 26 (2015) 257–264, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.03.034>.
- M. Boskovic, N. Zdravkovic, J. Ivanovic, J. Janjic, J. Djordjevic, M. Starcevic, M. Z. Baltic, Antimicrobial activity of thyme (*thymus vulgaris*) and oregano (*origanum vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms, *Procedia Food Sci* 5 (2015) 18–21, <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.005>.
- ISO - ISO 4730, Essential Oil of Melaleuca, Terpinen-4-Ol Type (Tea Tree Oil), 2017 (n.d.), <https://www.iso.org/standard/69082.html>.
- E. Yadav, S. Kumar, S. Mahant, S. Khatkar, R. Rao, Tea tree oil: a promising essential oil, *J. Essent. Oil Res.* 29 (2017) 201–213, <https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1232665>.
- C.F. Carson, K.A. Hammer, T.V. Riley, Melaleuca alternifolia (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006) 50–62, <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.50-62.2006>.
- F. Mondello, A. Girolamo, M. Scaturro, M.L. Ricci, Determination of Legionella pneumophila susceptibility to Melaleuca alternifolia Cheel (tea tree) oil by an improved broth micro-dilution method under vapour controlled conditions, *J. Microbiol. Methods* 77 (2009) 243–248, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.02.012>.
- N.T. Çakir, S. Kaleağasi, G. Kökdil, Tea tree oil: As a promising antimicrobial agent, *Ank. Univ. Eczacilik Fak. Derg.* 34 (2005) 315–327.
- C.F. Carson, T.V. Riley, Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*, *J. Appl. Bacteriol.* 78 (1995) 264–269, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb05025.x>.
- J. Sharifi-Rad, B. Salehi, E.M. Varoni, F. Sharopov, Z. Yousef, S.A. Ayatollahi, F. Kobarfard, M. Sharifi-Rad, M.H. Afdjei, M. Sharifi-Rad, M. Iriti, Plants of the melaleuca genus as antimicrobial agents: from farm to pharmacy, *Phyther. Res.* 31 (2017) 1475–1494, <https://doi.org/10.1002/ptr.5880>.
- M. Casarin, J. Pazinato, R.C.V. Santos, F.B. Zanatta, Melaleuca alternifolia and its application against dental plaque and periodontal diseases: a systematic review, *Phyther. Res.* 32 (2018) 230–242, <https://doi.org/10.1002/ptr.5974>.
- A. Catalán, J.G. Pacheco, A. Martínez, M.A. Mondaca, In vitro and in vivo activity of melaleuca alternifolia mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*, *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology.* 105 (2008) 327–332, <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.08.025>.
- M. Ebling De Souza, L. Quintana Soares Lopes, R. De Almeida Vaucher, D. Nunes Mário, S. Hartz Alves, V. Albertina Agertt, B. Vendruscolo Bianchini, S. Iensen Felicidade, M. Matiko Anrako De Campus, A. Augusti Boligon, M. Linde Athayde, C. Genro Santos, R. Platchek Raffin, P. Gomes, R. Christ Vianna Santos, Antimycobacterial and antifungal activities of Melaleuca alternifolia oil nanoparticles, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 24 (2014) 559–560, [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(14\)50105-0](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(14)50105-0).
- L. de O Felipe, W.F. da S Júnior, K.C. de Araújo, D.L. Fabrino, Lactoferrin, chitosan and Melaleuca alternifolia—natural products that show promise in candidiasis treatment, *Braz. J. Microbiol.* 49 (2018) 212–219, <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.05.008>.
- R.C.V. Santos, L.Q.S. Lopes, C.F. dos, S. Alves, V.P. Fausto, K. Pizzutti, V. Barboza, M.E. de Souza, R.P. Raffin, P. Gomes, D. Takamatsu, Y. Morinaga, A.A. Boligon, M. L. Athayde, C.C. Felippi, R. de Almeida Vaucher, Antimicrobial activity of tea tree oil nanoparticles against American and European fowlbrood diseases agents, *J. Asia Pac. Entomol.* 17 (2014) 343–347, <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2014.02.003>.
- M.E. Souza, L.Q.S. Lopes, P.C. Bonez, A. Gündel, D.S.T. Martínez, M.R. Sagrillo, J. L. Giongo, R.A. Vaucher, R.P. Raffin, A.A. Boligon, R.C.V. Santos, Melaleuca alternifolia nanoparticles against *Candida* species biofilms, *Microb. Pathog.* 104 (2017) 125–132, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.023>.
- A. Garozzo, R. Timpanaro, A. Stivala, G. Bisignano, A. Castro, Activity of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Influenza virus A/PR/8: study on the mechanism of action, *Antivir. Res.* 89 (2011) 83–88, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.11.010>.
- S. Nuding, L. Zabel, K. Fellermann, J. Wehkamp, R. Timpanaro, A. Garozzo, B. Bisignano, A. Stivala, G. Temperra, H.H. Zedegan, M. Sattari, Z.M. Hasan, A. Allameh, Antimicrobial Effects and Mechanisms, (n.d.) 500.
- E.V. Usachev, O.V. Pyankov, O.V. Usacheva, I.E. Agranovski, Antiviral activity of tea tree and eucalyptus oil aerosol and vapour, *J. Aerosol Sci.* 59 (2013) 22–30, <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2013.01.004>.
- M.D. Baldissera, A.S. Da Silva, C.B. Oliveira, R.C.V. Santos, R.A. Vaucher, R. P. Raffin, P. Gomes, M.G.C. Dambros, L.C. Miletti, A.A. Boligon, M.L. Athayde, S. G. Monteiro, Trypanocidal action of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Trypanosoma evansi* in vitro and in vivo used mice as experimental model, *Exp. Parasitol.* 141 (2014) 21–27, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.03.007>.
- M.D. Baldissera, T.H. Grandó, C.F. Souza, L.T. Gressler, L.M. Stefani, A.S. da Silva, S.G. Monteiro, In vitro and in vivo action of terpinen-4-ol, γ -terpinene, and α -terpinene against *Trypanosoma evansi*, *Exp. Parasitol.* 162 (2016) 43–48, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.01.004>.
- B.M. Hausen, Melaleuca oil (tea tree oil) dermatitis, *J. Am. Acad. Dermatol.* 30 (1994) 423–427, [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(94\)70050-8](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(94)70050-8).
- G. Shah, U.S. Baghel, Melaleuca alternifolia : a review of the medicinal uses, *pharmacology and phytochemistry* 10 (2017) 418–427.
- K.A. Hammer, C.F. Carson, T.V. Riley, Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil), *Am. J. Infect. Contr.* 24 (1996) 186–189, [https://doi.org/10.1016/S0196-6553\(96\)90011-5](https://doi.org/10.1016/S0196-6553(96)90011-5).
- K.P.R. Chowdary, A. Srinivasa Rao, Nanoparticles as drug carriers, *Indian Drugs* 34 (1997) 549–556, <https://doi.org/10.1533/9781908818195.29>.
- Y. Pathak, D. Thassu, Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization, 2016, <https://doi.org/10.3109/9781420078053>.
- M. Li, L. Zhu, B. Liu, L. Du, X. Jia, L. Han, Y. Jin, Tea tree oil nanoemulsions for inhalation therapies of bacterial and fungal pneumonia, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 141 (2016) 408–416, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.017>.
- F. Donsi, M. Annunziata, M. Sessa, G. Ferrari, Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods, *LWT - Food Sci. Technol. (Lebensmittel-Wissenschaft - Technol.)* 44 (2011) 1908–1914, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.03.003>.
- A. Wulansari, M. Jufri, A. Budianti, Studies on the formulation, physical stability, and in vitro antibacterial activity of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) nanoemulsion gel, *Int. J. Appl. Pharm.* 9 (2017) 135–139, <https://doi.org/10.22159/ijap.2017.v9i1.73.80>.
- R. Najafi-taher, B. Ghaemi, S. Kharazi, S. Rasoulkoochi, A. Amani, Promising antibacterial effects of silver nanoparticle-loaded tea tree oil nanoemulsion: a synergistic combination against resistance threat, *AAPS PharmSciTech* 19 (2018) 1133–1140, <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0922-y>.
- V.M. Comin, L.Q.S. Lopes, P.M. Quatrin, M.E. de Souza, P.C. Bonez, F.G. Pintos, R. P. Raffin, R. de A. Vaucher, D.S.T. Martinez, R.C.V. Santos, Influence of Melaleuca alternifolia oil nanoparticles on aspects of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, *Microb. Pathog.* 93 (2016) 120–125, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.01.019>.
- M.G. Madalosso, R.C. V Santos, Journal of Asia-Paci fi c Entomology In vitro and in vivo e ffects of Melaleuca alternifolia nanoparticles in 20 (2017) 1344–1349, <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.10.002>.
- F.C. Flores, J.A. de Lima, R.F. Ribeiro, S.H. Alves, C.M.B. Rolim, R.C.R. Beck, C. B. da Silva, Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *trichophyton rubrum*, *Mycopathologia* 175 (2013) 281–286, <https://doi.org/10.1007/s11046-013-9622-7>.
- F.C. Flores, R.F. Ribeiro, C. de B. da Silva, Antifungal activity of nanocarriers containing tea tree oil on the growth of *C. albicans*: an inhibition profile study Fernanda. <https://periodicos.ufsm.br/cienciaenatura/article/view/19528/pdf>, 2015. (Accessed 6 April 2020).
- W.L. Low, C. Martin, D.J. Hill, M.A. Kenward, Antimicrobial efficacy of liposome-encapsulated silver ions and tea tree oil against *Pseudomonas aeruginosa*, *staphylococcus aureus* and *candida albicans*, *Lett. Appl. Microbiol.* 57 (2013) 33–39, <https://doi.org/10.1111/lam.12082>.
- S. Sur, A. Rathore, V. Dave, K.R. Reddy, R.S. Chouhan, V. Sadhu, Recent developments in functionalized polymeric nanoparticles for efficient drug delivery system, *Nano-Structures and Nano-Objects* 20 (2019) 100397, <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2019.100397>.
- F.C. Flores, F.C. Flores, R.F. Ribeiro, C.D.B. Da Silva, Atividade antifúngica de nanocarreadores contendo óleo de melaleuca no crescimento de *C. albicans*: um estudo do perfil de inibição, *Cienc. Nat.* 37 (2015) 1, <https://doi.org/10.5902/2179460X19528>.
- K. Sou, Curcumin towards nanomedicine, *Recent Pat. Nanomed.* 2 (2012) 133–145, <https://doi.org/10.2174/1877912311202020133>.
- C.I.C. Crucho, M.T. Barros, Polymeric nanoparticles: a study on the preparation variables and characterization methods, *Mater. Sci. Eng. C* 80 (2017) 771–784, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.004>.
- B. Prakash, A. Kujur, A. Yadav, A. Kumar, P.P. Singh, N.K. Dubey, Nanoencapsulation: an efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system, *Food Contr.* 89 (2018) 1–11, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.018>.
- S.P. De Matos, H.F. Teixeira, Á.A.N. De Lima, V.F. Veiga-Junior, L.S. Koester, Essential oils and isolated terpenes in nanosystems designed for topical administration: a review, *Biomolecules* 9 (2019), <https://doi.org/10.3390/biom9040138>.
- J. Priya, A. Naha, A.S. Dhoot, N. Xalxo, A review on polymeric nanoparticles: a promising novel drug delivery system, *J. Glob. Pharma Technol.* 10 (2018) 10–17.
- F.C. Flores, R.F. Ribeiro, A.F. Ourique, C.M.B. Rolim, C. De Bona Da Silva, A. R. Pohlmann, R.C.R. Beck, S.S. Guterres, Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization, *Quim. Nova* 34 (2011) 968–972, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000600010>.

- [44] C.S.O. Paulo, M. Vidal, L.S. Ferreira, Antifungal nanoparticles and surfaces, *Biomacromolecules* 11 (2010) 2810–2817, <https://doi.org/10.1021/bm100893r>.
- [45] Y. Zhai, G. Zhai, Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery, *J. Contr. Release* 193 (2014) 90–99, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.054>.
- [46] Y. Chen, X. Yang, L. Zhao, L. Almásy, V.M. Garamus, R. Willumeit, A. Zou, Preparation and characterization of a nanostructured lipid carrier for a poorly soluble drug, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 455 (2014) 36–43, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.04.032>.
- [47] P. Ganesan, D. Narayanasamy, Lipid nanoparticles: different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery, *Sustain. Chem. Pharm.* 6 (2017) 37–56, <https://doi.org/10.1016/j.scp.2017.07.002>.
- [48] R.H. Müller, R.D. Petersen, A. Hommoss, J. Pardeike, Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 522–530, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.04.012>.
- [49] J. Pardeike, A. Hommoss, R.H. Müller, Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products, *Int. J. Pharm.* 366 (2009) 170–184, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.10.003>.
- [50] P. Severino, M.H.A. Santana, S.M. Malmonge, E.B. Souto, Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos, *Polímeros* 21 (2011) 361–368, <https://doi.org/10.1590/S0104-14282011005000061>.
- [51] S. kaur, U. Nautyal, R. Singh, S. Singh, A. Devi, Nanostructure Lipid Carrier (NLC): the new generation of lipid nanoparticles, *Asian Pacific J. Heal. Sci.* 2 (2015) 76–93, <https://doi.org/10.21276/apjhs.2015.2.2.14>.
- [52] P. Ghasemiyeh, S. Mohammadi-Samani, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages, *Res. Pharm. Sci.* 13 (2018) 288–303, <https://doi.org/10.4103/1735-5362.235156>.
- [53] N.P. Aditya, A.S. Macedo, S. Doktorovova, E.B. Souto, S. Kim, P.S. Chang, S. Ko, Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: a comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE), *LWT - Food Sci. Technol. (Lebensmittel-Wissenschaft - Technol.)* 59 (2014) 115–121, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.058>.
- [54] F. Brugè, E. Damiani, F. Marcheggiani, A. Offerta, C. Puglia, L. Tiano, A comparative study on the possible cytotoxic effects of different nanostructured lipid carrier (NLC) compositions in human dermal fibroblasts, *Int. J. Pharm.* 495 (2015) 879–885, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.09.033>.
- [55] R.H. Müller, M. Radtke, S.A. Wissing, Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2002), [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00118-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00118-7).
- [56] W. Mehnert, K. Mäder, Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2001) 165–196, [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00105-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00105-3).
- [57] N.S. Ranpise, S.S. Korabu, V.N. Ghodake, Second generation lipid nanoparticles (NLC) as an oral drug carrier for delivery of lercanidipine hydrochloride, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 116 (2014) 81–87, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.12.012>.
- [58] M.A. Iqbal, S. Md, J.K. Sahni, S. Baboota, S. Dang, J. Ali, Nanostructured lipid carriers system: recent advances in drug delivery, *J. Drug Target.* 20 (2012) 813–830, <https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.716845>.
- [59] F.C. Flores, K. Paese, J. Weber, J.B. Antunes, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, R.C. Beck, C. de B da Silva, Lipid nanoparticles obtained with innovative natural materials for topical delivery of tioconazole: mangospheres, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 17 (2017) 1762–1770, <https://doi.org/10.1166/jnn.2017.13019>.
- [60] C.F. Souza, M.D. Baldissera, N.S. Guarda, Y.S. Bollick, R.N. Moresco, I.C. M. Brusque, R.C.V. Santos, B. Baldisserotto, Melaleuca alternifolia essential oil nanoparticles ameliorate the hepatic antioxidant/oxidant status of silver catfish experimentally infected with *Pseudomonas aeruginosa*, *Microb. Pathog.* 108 (2017) 61–65, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.016>.
- [61] W. Mehnert, K. Mäder, Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 83–101, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.021>.
- [62] M. Ebling, D. Souza, D. Jornada, C. Marina, G. Fleck, P. Maciel, L. Ebling, P. Cordeonensi, C. Fillippi, R. Pippi, F. Batistin, A. Gundel, D. Stefani, T. Martinez, R. De Almeida, R. Christ, V. Santos, Microbial Pathogenesis Antimicrobial activity of Melaleuca alternifolia nanoparticles in polymicrobial bio, *fi lm in situ* 113 (2018) 432–437.
- [63] A. Rezaei, M. Fathi, S.M. Jafari, Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers, *Food Hydrocolloids* 88 (2018) 146–162, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.003>.
- [64] T. Tadros, P. Izquierdo, J. Esquena, C. Solans, Formation and stability of nano-emulsions, *Adv. Colloid Interface Sci.* (2004) 303–318, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>, 108–109.
- [65] N. Usón, M.J. García, C. Solans, Formation of water-in-oil (W/O) nano-emulsions in a water/mixed non-ionic surfactant/oil systems prepared by a low-energy emulsification method, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 250 (2004) 415–421, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.03.039>.
- [66] F. Bruxel, M. Laux, L.B. Wild, M. Fraga, L.S. Koester, H.F. Teixeira, Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos, *Quim. Nova* 35 (2012) 1827–1840, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000900023>.
- [67] N. Anton, T.F. Vandamme, Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences, *Pharm. Res. (N. Y.)* 28 (2011) 978–985, <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0309-1>.
- [68] P. Desai, R.R. Patilola, M. Singh, Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery, *Mol. Membr. Biol.* 27 (2010) 247–259, <https://doi.org/10.3109/09687688.2010.522203>.
- [69] I. Ghosh, D. Schenck, S. Bose, C. Ruegger, Optimization of formulation and process parameters for the production of nanosuspension by wet media milling technique: effect of Vitamin e TPGS and nanocrystal particle size on oral absorption, *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* 47 (2012) 718–728, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.08.011>.
- [70] H. He, Y. Lu, J. Qi, Q. Zhu, Z. Chen, W. Wu, Author's Accepted Manuscript Adapting liposomes for oral drug delivery Adapting liposomes for oral drug delivery, *Acta Pharm. Sin. B* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.06.005>.
- [71] A.D.D. Bangham, R.W.W. Horne, Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope, *J. Mol. Biol.* 8 (1964) 660–668, [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(64\)80115-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(64)80115-7).
- [72] O.M. Koo, I. Rubinstein, H. Onyuksel, Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 1 (2005) 193–212, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.06.004>.
- [73] N. Ghalandarlaki, A.M. Alizadeh, S. Ashkani-Esfahani, Nanotechnology-applied curcumin for different diseases therapy, *BioMed Res. Int.* 2014 (2014), <https://doi.org/10.1155/2014/394264>.
- [74] F. Aqil, R. Munagala, J. Jeyabalan, M. Vadhanam, F. Aqil, R. Munagala, J. Jeyabalan, M.V. Vadhanam, Bioavailability of phytochemicals and its enhancement by drug delivery systems, *Canc. Lett.* 334 (1) (2013) 133–141, 34 (2013) 133–141.
- [75] A. Akbarzadeh, R. Rezaei-sadabady, S. Davaran, S.W. Joo, N. Zarghami, *Liposome : Classification , Preparation , and Applications*, 2013, pp. 1–9.
- [76] M.J.W. Johnston, S.C. Semple, S.K. Klimuk, S. Ansell, N. Maurer, P.R. Cullis, Characterization of the drug retention and pharmacokinetic properties of liposomal nanoparticles containing dihydrosphingomyelin, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1768 (2007) 1121–1127, <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2007.01.019>.
- [77] T.S. Pereira, J.R. de Sant'Anna, E.L. Silva, A.L. Pinheiro, M.A.A. de Castro-Prado, In vitro genotoxicity of Melaleuca alternifolia essential oil in human lymphocytes, *J. Ethnopharmacol.* 151 (2014) 852–857, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.11.045>.
- [78] P. Kulkarni, D. Rawtani, M. Kumar, S.R. Lahoti, Cardiovascular drug delivery: a review on the recent advancements in nanocarrier based drug delivery with a brief emphasis on the novel use of magnetoliposomes and extracellular vesicles and ongoing clinical trial research, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 60 (2020) 102029, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102029>.
- [79] A. Sharma, U.S. Sharma, Liposomes in drug delivery: progress and limitations, *Int. J. Pharm.* 154 (1997) 123–140, [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00135-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00135-X).
- [80] W.L. Low, C. Martin, D.J. Hill, M.A. Kenward, Antimicrobial efficacy of liposome-encapsulated silver ions and tea tree oil against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, *Lett. Appl. Microbiol.* 57 (2013) 33–39, <https://doi.org/10.1111/lam.12082>.
- [81] Y.S. Lee, P.J. Johnson, P.T. Robbins, R.H. Bridson, Production of nanoparticles-in-microcapsules by a double emulsion method: a comprehensive study, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 83 (2013) 168–173, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.10.016>.
- [82] C.Y. Wong, H. Al-Salami, C.R. Dass, Microparticles, microcapsules and microspheres: a review of recent developments and prospects for oral delivery of insulin, *Int. J. Pharm.* 537 (2018) 223–244, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.12.036>.
- [83] L. Andreani, R. Cercenà, B.G.Z. Ramos, V. Soldi, Development and characterization of wheat gluten microspheres for use in a controlled release system, *Mater. Sci. Eng. C* 29 (2009) 524–531, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.09.046>.
- [84] W.H. Liu, J.L. Song, K. Liu, D.F. Chu, Y.X. Li, Preparation and in vitro and in vivo release studies of Huperzine A loaded microspheres for the treatment of Alzheimer's disease, *J. Contr. Release* 107 (2005) 417–427, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.03.025>.
- [85] M. Li, O. Rouaud, D. Poncellet, Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches, *Int. J. Pharm.* 363 (2008) 26–39, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.018>.
- [86] D. Gaddam, K. Medical, S. Corporation, *Indian Journal of Pharmaceutical Science & Research*, *Indian J. Pharm. Sci.* 2 (2014) 63–74.
- [87] M.Á. Pérez-Limiñana, F.J. Payá-Nohales, F. Arán-Ais, C. Orgilés-Barceló, Effect of the shell-forming polymer ratio on the encapsulation of tea tree oil by complex coacervation as a natural biocide, *J. Microencapsul.* 31 (2014) 176–183, <https://doi.org/10.3109/02652048.2013.824512>.

CAPÍTULO 2

Nanoemulsion and nanocapsules of Melaleuca alternifolia essential oil in sepsis

INTRODUÇÃO

Este capítulo relata o desenvolvimento de nanoemulsões e nanocápsulas contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, denominadas NE-TTO e NC-TTO, respectivamente, bem como sua avaliação físico-química, perfil de estabilidade e potencial interesse destes sistemas na proteção sobre disfunções causadas pela sepse. Nesse sentido, inicialmente uma metodologia para quantificação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* por cromatografia gasosa com injetor headspace acoplado a um detector de massas foi desenvolvida e validada. Para a otimização das formulações, foram avaliados o tipo e a quantidade de tensoativo na fase aquosa das nanoemulsões, bem como o polímero para a formação das nanocápsulas. Os sistemas preparados foram caracterizados quanto ao tamanho médio, polidispersão, potencial zeta, teor do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e morfologia. A estabilidade frente à temperatura (4 e 25 °C) e à luz das formulações e de nanopartículas brancas (BN, formulação semelhante às nanocápsulas suprimindo o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*) e óleo livre, utilizados como controles, foi avaliada por um período de 60 dias. Na sequência, após análise da citotoxicidade, os sistemas foram avaliados em modelo *in vivo* de sepse induzida por ligadura e punção do ceco.

Os resultados deste trabalho foram compilados em forma de artigo e foram submetidos à revista *Materials Science and Engineering C* (Fator de impacto 5,88)

Development of *Melaleuca alternifolia* essential oil nanoemulsions and nanocapsules for sepsis

Mariana Alves Battisti, Larissa Constantino, Thiago Caon, Flávio Henrique
Reginatto, Angela Machado de Campos*

*Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PGFAR), Departamento de Ciências
Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade,
88040-900, Florianópolis, SC, Brazil*

*Corresponding author: angela.campos@ufsc.br

ABSTRACT

Sepsis is a complex clinical syndrome resulting from a harmful host response to infection. The infections most associated with sepsis are pneumonia, intra-abdominal infection and urinary tract infection. Tea tree oil (TTO) has shown high antibacterial activity; however, it exhibits low aqueous solubility and high volatility, limiting its therapeutic application. Colloidal carriers have been selected to overcome these limitations. Nanoemulsions (NE) and nanocapsules (NC) with TTO were prepared by the spontaneous emulsification and nanoprecipitation methods, respectively. The selection of Pluronic® F68 and Eudragit® RS100 resulted in more homogeneous and stable nanoparticles. In accelerated stability studies at 4 °C and 25°C, both colloidal suspensions (NC and NE) were kinetically stable; however, NC provided greater stability to photodegradation. NC also showed less *in vitro* cytotoxicity than NE. After sepsis induction by the cecal ligation and puncture (CLP) model, both NE and NC reduced neutrophil infiltration levels in peritoneal lavage (PL) and kidney. Moreover, the systems increased group thiols in the kidney and lungs and reduced the bacterial growth in PL. Taken together, both systems proved to be effective against injury induced by sepsis; however, NC should be selected, primarily due to its advantages in terms of cytotoxicity and physicochemical stability.

Keywords: sepsis; tea tree oil; *Melaleuca alternifolia*; nanoemulsion; nanocapsules.

1. INTRODUCTION

Sepsis is a complex syndrome resulting in an uncontrolled inflammatory process followed by immunosuppression, which can lead to end-stage organ dysfunction and death (CAO; YU; CHAI, 2019). It is considered a disease of severe immune dysregulation that involves both innate and adaptive immune responses². It represents one of the major causes of morbidity and mortality in critically ill patients. It is estimated that more than thirty million people are affected by sepsis worldwide every year, potentially resulting in six million deaths (MILIOLI et al., 2019).

Despite the diversity of antibiotics currently available on the market to treat the disease, problems of bacterial resistance represent a growing global health threat. More than 30% of deaths due to neonatal sepsis are associated with antibiotic resistance (UPPU; GHOSH; HALDAR, 2015). In this context, the investigation of natural products as sources of bioactive compounds seems to be a promising approach. These compounds may be able to attack microorganisms, modulate the host's immune system and neutralize toxic free radicals. Another advantage is that toxicity problems associated with synthetic antibiotics could be reduced or even avoided (WANG; XU; LEWIN, 2009).

Essential oils are volatile secondary metabolites naturally produced by plants, which may have antibacterial, antifungal, insecticidal, antiviral and immunomodulatory properties (HAMMER, 2015; QUINTANS et al., 2019; RAMAGE et al., 2012). Tea tree oil (TTO) is composed of more than a hundred volatile constituents, particularly oxygenated hydrocarbons, monocyclic and bicyclic monoterpenes (BROPHY et al., 1989). The essential oil is extracted from the Australian native plant known as *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) by steam distillation (HALCÓN; MILKUS, 2004). The major constituents of TTO include terpinen-4-ol, γ -terpinene, α -terpinene, 1,8-cineole, and α -terpineol. In addition to antibacterial (DRYDEN; DAILLY; CROUCH, 2004), antiviral (GAROZZO et al., 2011) and antifungal properties (HAMMER; CARSON; RILEY, 2003), TTO also has anti-inflammatory (WONG et al., 2015) and antioxidant action (ZHANG et al., 2018). Despite the potential pharmacological actions of TTO, phenomena such as irritation and allergic reactions, its volatilization, and its instability in the presence of light or oxygen, have limited the formulation steps and thus, its therapeutic action (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006; YADAV et al., 2017).

In this context, nanocapsules (NC) and nanoemulsions (NE) have been extensively studied as colloidal delivery systems in an attempt to overcome these limitations. NCs are composed of a polymeric core-shell structure, in which the polymer surrounds an oily core.

NEs, in turn, are biphasic systems consisting of vegetable, synthetic or semi-synthetic oils and an aqueous phase. These two phases are stabilized by a surfactant capable of reducing the surface tension between them and generating nanometric-sized drops (BATTISTI; CAON; CAMPOS, 2020).

NC and NE suspensions were prepared by interfacial deposition of preformed polymer and the spontaneous emulsification technique, respectively. The composition of the systems was optimized based on the particle size, zeta potential and polydispersity index. *In vitro* cytotoxicity and physical and chemical stability studies were also carried out. Finally, the effect of colloidal suspensions in the kidney, lung and peritoneal lavage of mice was evaluated after sepsis induction by the cecal ligation puncture (CLP) model.

2 EXPERIMENTAL

2.1 MATERIALS

The tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) was obtained from Ferquima (São Paulo, Brazil). γ -terpinene (MW 136.26), poly- ϵ -caprolactone (PCL, MW 60.000) and Eudragit® RS100 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Poloxamer 188 (Lutrol F68®) was kindly donated by BASF Chemical Company (Ludwigshafen, Germany). All the other chemicals and solvents used were of pharmaceutical-grade materials and were used as received, without any further purification.

2.2 VALIDATION METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF Γ -TERPINENE

2.2.1 Equipment

The GC-MS measurements were performed in an Agilent 7890A GC system equipped with an Agilent headspace autosampler and coupled to a mass selective detector (Agilent Technologies, CA, USA). The data were analyzed using the standard software program supplied by the manufacturer (Agilent ChemStation).

2.2.2 GC-MS conditions

In the quantification step of γ -terpinene, a HP-5MS capillary column (30 m x 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μ m) was used. The oven temperature was initially set to 50 °C for 6 min, increased to 100 °C at 3 °C min⁻¹ and finally raised to 230 °C at 20 °C min⁻¹ for 5 min. Direct terpene vaporization from capped glass vials was performed at 60 °C for 22 min. Helium

(purity 99%) was used as carrier gas (flow rate of 1 mL min⁻¹). Mass spectrometry with electron impact ionization mode at 70 eV in selected ion monitoring mode was used to acquire the analytical signals.

2.2.3 Preparation of analytical curves

Stock solutions of 75 µg mL⁻¹ of γ-terpinene were prepared in hexane. The standard solutions were prepared by diluting the stock solution in hexane (25, 35, 50, 60, and 75 µg mL⁻¹). All chromatographic analyses were performed in triplicate and the average peak areas were calculated. Quantification of the individual compounds was performed using a validated regression curve ($r > 0.999$).

2.2.4 Validation of the GC-MS method

The validation was carried out according to the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines. The parameters evaluated were specificity, linearity, precision (intermediate precision and repeatability), limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ). Specificity was evaluated by comparing the chromatograms of blank nanoparticles with those of the TTO solution. Linearity was determined by calculating the regression line from the curve that relates the peak area ratio and solution concentrations (25, 35, 50, 60, and 75 µg mL⁻¹). Intermediate precision was determined by analyzing, in triplicate, three different standard solutions (25, 50 and 75 µg mL⁻¹) on three different days. Repeatability was determined by considering a single standard solution (50 µg mL⁻¹), which was analyzed six times on the same day. The calculations were expressed as relative standard deviation (RSD) (BRASIL, 2021). The LOD and LOQ were calculated according to the following equations:

$$LOD = \frac{3 \times \sigma}{S} (1)$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{S} (2)$$

where “σ” is the standard deviation of y-axis interception values of the calibration curves and “S” is the angular coefficient of the calibration curve.

2.3 DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF COLLOIDAL SYSTEMS

2.3.1 Preparation of nanoemulsions

The nanoemulsions (NE-TTO) were prepared by the spontaneous emulsification technique (SURH; DECKER; MCCLEMENTS, 2017). The organic phase was composed of TTO (0.5 g), soy lecithin (0.05 g), propylene glycol (2 mL) and acetone (10 mL). This lipophilic solution was added under magnetic stirring into an aqueous solution (50 mL) containing different concentrations (0.5, 1.0 or 1.5% w/V) of Tween® 80 or Pluronic® F68. Acetone was removed by evaporation under reduced pressure and the final volume of nanoemulsion was adjusted to 20 mL.

2.3.2 Preparation of nanocapsules

Nanocapsules were prepared by interfacial deposition of preformed polymer. Briefly, an organic phase composed of 0.1 g polymer (poly- ϵ -caprolactone or Eudragit® RS100), soy lecithin (0.05 g), propylene glycol (2 mL), TTO (2.5 % V/V) and acetone (10 mL) was added to an aqueous solution (50 mL) containing Pluronic® F68 1.5 % under magnetic stirring for 5 min. The resulting colloidal suspensions were concentrated under reduced pressure to eliminate the organic solvent. The final volume of the formulations was fixed in 20 mL to obtain an oil concentration of 2.5 %. As control, nanoparticles (BN) without TTO were prepared.

2.4 PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION

2.4.1 Particle size, polydispersity index and zeta potential analysis

The particle size and polydispersity index (PDI) of the colloidal suspensions were measured by photon correlation spectroscopy after dilution in ultrapure water (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The zeta potential values of these samples were measured by laser-doppler anemometry at 25 °C, using the same instrument after proper dilution in ultrapure water. All analyses were performed in triplicate.

2.4.2 Determination of oil content

The total content (%) of oil in the NE-TTO and NC-TTO was determined using a previously validated CG-MS method. Initially, aliquots of colloidal suspensions (200 μ L) were added to 2 mL of dimethyl sulfoxide and maintained under magnetic stirring for 5 min until complete solubilization of the constituents. The concentration of γ -terpinene was then calculated from the previously obtained calibration curve.

2.4.3 TEM analyses

Morphological analyses were performed by transmission electron microscopy operating at 80 kV. The samples (NE-TTO and NC-TTO) were first diluted and negatively stained with phosphotungstic acid (0.5% w/v) on Formvar-Carbon copper grids.

2.5 *IN VITRO* CYTOTOXICITY ASSAY

The cytotoxicity of free TTO, BN, NE-TTO and NC-TTO was evaluated by the sulforhodamine B assay (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). Human embryonic kidney (HEK 293) and Murine macrophage (RAW 264) cells (2.5×10^5 cells per well) were grown into 96 well plates in MEM supplemented with 5% FBS and maintained at 37 °C and 5 % CO₂. Before the cytotoxicity assay, TTO was dissolved in DMSO and the formulations were filtered through a 0.22 µm sterile filter. Confluent cells were exposed to different concentrations of these samples for 24 and 48 h. Cells exposed to MEM or DMSO were used as controls. After the exposure period, cells were fixed in situ by adding 66 µL of cold trichloroacetic acid (10 %, w/v) and incubated for 60 min at 4 °C. The supernatant was then discarded, and the plates were washed five times with tap water and air-dried. Sulforhodamine B solution (100 µL) was added to each well and the plates were incubated for 30 min at room temperature. After staining, the residual dye was removed by sequential washes with 1% acetic acid. The plates were dried at room temperature and subsequently eluted with 10 mM trizma base. The absorbance was read on a plate reader at 510 nm. For the determination of CC50 values, nonlinear regression models of concentration-response curves were used. The 50% cytotoxic concentration (CC50) was defined as the concentration that reduced cell viability by 50% when compared to untreated controls.

2.6 REAL-TIME STABILITY STUDY

Physicochemical parameters such as particle size, PDI, zeta potential, pH and loading of NE-TTO, NC-TTO, NB and TTO, stored at 4 °C and 25 °C, were evaluated at 0, 5, 15, 30, 45 and 60 days. All the experiments were performed in triplicate. The photodegradation of samples was studied using an UV artificial lamp emitting 254 nm wavelength (TUV 30 W/ G30 TB, Philips, The Netherlands). Stability data were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test, with a significance level of $p < 0.05$. All the statistical analyses were performed using GraphPad Prism[®] 5 software (San Diego, USA).

2.7 ACCELERATED STABILITY STUDY

The accelerated stability of NE-TTO, NC-TTO and NB stored at 4 °C was investigated using an analytical centrifuge LUMiSizer (L.U.M. GmbH, Germany), which consists of a centrifugal rotor with 106.12 optical cells and a light source (pulsed near-infrared light emitting 880 nm diode and a light sensor). This equipment measures the intensity of the transmitted near-infrared light as a function of time and position over the entire sample length, while the samples are simultaneously subjected to centrifugal force, providing information about instability phenomena, such as sedimentation, flocculation or creaming. For the analysis, 400 µL of each sample was placed in polycarbonate optical cells and subjected to rotation at 4.000 rpm for 7.650 s, at temperatures of 4 °C and 25 °C, and interval time of 30 s, according Yuan et al (2013). The samples were analyzed in triplicate without prior dilution. The results were displayed as space- and time-related transmission profiles over the sample and instability index.

2.8 CYTOTOXICITY ASSAY

Cytotoxicity of free TTO, NB, NE-TTO and NC-TTO were assessed by the sulforhodamine B assay. HEK 293 and RAW 264 cells (2.5×10^5 cells per well) were cultured in 96 well plates in MEM supplemented with 5 % FBS and maintained at 37 °C and 5% CO₂. Before the cytotoxicity assay, TTO dissolved in DMSO and the formulations were filtered through a 0.22 µm sterile filter. Confluent cells were exposed to different concentrations of these samples for 24 h and 48 h. Cells exposed to MEM or DMSO without samples were used as controls. After the exposure period, cells were fixed in situ by adding 66 µL of cold 10% (w/v) TCA, and incubated for 60 minutes at 4 °C. The supernatant was discarded; the plates were washed five times with tap water and air dried. sulforhodamine B solution (100 µL) was added to each well, and the plates were incubated for 30 minutes at room temperature. After staining, the residual dye was removed by washing five times with 1 % acetic acid. The plates were air dried. The bound stain was subsequently eluted with 10 mM trizma base and the absorbance was read on a plate reader at a wavelength of 510 nm. To determine the CC₅₀ values, nonlinear regression of the concentration response curves was used. The 50 % cytotoxic concentration (CC₅₀) was defined as the concentration that reduced cell viability by 50 % when compared to untreated controls.

2.9 *IN VIVO* EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.9.1 Animals

Male Swiss mice (8 weeks old, 25-35 g) were obtained from the Animal Care Unit of Universidade Federal de Santa Catarina. The animals were kept in plastic cages (five animals per cage) with 12-h light/dark cycles and controlled temperature (23 ± 2 °C), receiving water and food ad libitum. *In vivo* studies were performed in accordance with National Institutes of Health (NIH) guidelines, and approval of the Universidade Federal de Santa Catarina ethics committee (Protocol number: PP00963) was obtained prior to the study.

2.9.2 Cecal ligation puncture (CLP) model

Mice were anesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). In aseptic conditions, a 3-cm midline laparotomy was performed to expose the cecum with the adjoining intestine. The cecum was tightly ligated with a 3.0-silk suture at its base, below the ileocecal valve, and perforated twice with a 30-gauge needle. The cecum was then gently squeezed to extrude a small quantity of feces from the perforation site. The laparotomy was closed with a 4.0-silk suture. The animals were resuscitated with regular saline (50 mL/kg) injected subcutaneously (s.c.) 12 h after CLP. All animals received basic support (saline at 50 mL/kg immediately and 12 h after CLP plus ceftriaxone and metronidazole at 50 mg/kg every 8 h, s.c.). All animals were returned to the cages with free access to food and water. In this model, the rats develop bacteremia with Gram-negative enteric organisms (RITTER et al., 2003).

2.9.3 Experimental protocols

For the biochemical analysis (described below sections), animals were randomly separated into 4 groups: group 1, CLP saline; group 2, BN; group 3, NE-TTO and group 4, NC-TTO. For the treatment, 0.5 mL of NE-TTO, NC-TTO (2.5 % V/V of TTO), BN or saline solution was injected intraperitoneally 1 h after the CLP procedure. The animals were sacrificed 24 h after CLP and samples of kidney, lung and peritoneal lavage were removed and immediately stored until biochemical analysis.

2.10 BIOCHEMICAL MEASUREMENTS

2.10.1 Neutrophil infiltration

Myeloperoxidase (MPO) activity was evaluated in tissue homogenates. Tissues were homogenized in 0.5 % hexadecyltrimethylammonium bromide and centrifuged at 15,000 g for 15 min. An aliquot of the supernatant was mixed with a solution of 1.6 mM tetramethylbenzidine and 1 mM hydrogen peroxide. The activity was measured at 650 nm at 37 °C using a Spectramax[®] (Sunnyvale, CA) microplate spectrophotometer. The results were expressed as mU per mg of protein (DE YOUNG et al., 1989).

2.10.2 Total sulfhydryl content

Oxidative stress status was evaluated by quantification of total reduced sulfhydryl (SH) groups in samples. For total sulfhydryl (SH) groups –SH content measurement, a 50 µL sample aliquot was diluted in phosphate-buffered saline (PBS) solution containing 10 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB). The results were reported as nmol TNB/mg protein (AKSENOV; MARKESBERY, 2001).

2.11 ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Samples collected 24 h after sepsis induction were used in the disk diffusion assay to evaluate the *in vivo* antibacterial activity of formulations containing TTO. The samples were seeded (10 µL) on plates containing Mueller-Hinton Agar, which were incubated at 37 °C (\pm 1°C) for 24 h, followed by the counting of colony-forming units (CFU).

2.12 STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was performed using the software program GraphPad Prism[®] 5 (San Diego, USA). Regression models (nonlinear and linear) were considered for analysis of both calibration and cytotoxicity curves. For multiple comparisons (more than two groups), ANOVA followed by the Tukey post hoc test was considered. A significance level of 5 % ($p < 0.05$) was selected.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 VALIDATION OF CG-MS METHOD

The composition of TTO is regulated by International Standard ISO 4730:2017, which determines the maximum and/or minimum concentrations of fourteen oil constituents. The quality of the TTO is associated with its chemical composition. The minimum permitted concentrations of terpinen-4-ol and γ -terpinene in TTO are 42 % and 21 %, respectively. The maximum permitted concentration of 1,8-cineol is 15 %, due to the irritant effect of this compound (YADAV et al., 2017). In this study, γ -terpinene was selected as the chemical marker for the analytical validation step. No peaks associated with the retention time of the γ -terpinene were observed in the comparison of chromatograms of the γ -terpinene solution with those obtained for BN, demonstrating that the developed method is selective. The analytical curve proved to be linear in the range of 25 to 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r=0.999$). The regression equation was $y = 16184x - 104005$, where “x” and “y” represent the concentration and the peak area (or analytical signal), respectively. The precision of a method indicates the degree of dispersity among independent test results obtained under given analytical conditions, and includes measurements on the same day (within-day or repeatability) and on different days (inter-day precision) (Table 1) (CONFERENCE et al., 2010). As the RSD values were lower than 5%, the developed method can be considered precise. The LOD and LOQ values for γ -terpinene were 0.51 and 1.56 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. These limits are suitable for detecting and quantifying γ -terpinene in NE-TTO and NC-TTO.

Table 1 Precision of developed GC-MS method.

Parameter	Theoretical concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Results		Interpretation
		Concentration obtained ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD %	Acceptability criteria
Intermediate precision	25	25.11	1.74	RSD < 5%
	50	50.74	0.57	RSD < 5%
	75	76.21	0.09	RSD < 5%
Repeatability	50	49.99	1.11	RSD < 5%

3.2 FORMULATION STUDIES

3.2.1 Nanoemulsion preparation

Nanoemulsions are colloidal systems with droplet sizes smaller than 300 nm that allow for the dispersion of active lipophilic agents in water, or even encapsulation, protection, and/or sustained/controlled release of these agents (BRUXEL et al., 2012a). As NEs are composed of an organic phase and an aqueous phase, surfactants should be considered, to ensure stabilization of the system or avoid phase separation. Combinations of surfactants have been shown to be more effective than the use of a single surfactant. Non-ionic surfactants combined with phospholipids result in more homogeneous systems, which improve the stability of the formulation (BRUXEL et al., 2012b). In this study, two hydrophilic biocompatible surfactants (SANTOS et al., 2017) (Pluronic[®] or Tween[®] 80) were combined with soy lecithin at a fixed concentration, aiming to stabilize the NEs.

Physicochemical characteristics (size, PDI and zeta potential) of NEs are presented in Table 2. Tween[®] 80-based NEs (NE-TTO-TW) presented high PDI (>0.4), zeta potential close to -13.0 mV and particle sizes ranging from 75 to 146 nm. On the other hand, more homogeneous NEs were obtained with Pluronic[®] (NE-TTO-PLU) given that low PDI values were found. When the concentration of Pluronic[®] was increased, a reduction in PDI values and an increase in zeta potential were observed. Particle sizes of 146 ± 1.1 nm and PDI ranging from 0.171 to 0.175 were found in 1.5% of Pluronic[®]. This concentration of surfactant proved sufficient to effectively cover the surface of nanoparticles and prevent droplet agglomeration. The values of zeta potential also were close to -30 mV or higher, indicating high physical stability for systems prepared with Pluronic[®]. Based on these findings, Pluronic[®] 1.5% (w/V) was selected for the subsequent assays. Mirkovic et al. (2017) also evaluated the effect of Pluronic[®] combined with lecithin in NE stabilization. This combination resulted in NEs with optimal physicochemical properties (PDI=0.1, size <200 nm and zeta potential >-30 mV). (MIRKOVIĆ et al., 2017) The TTO content after optimal NE preparation was 95.2 ± 0.5 %, following the results of Flores et al. (FLORES et al., 2011) Approximately 5 % of the oil was lost during the NE preparation, probably during the organic solvent evaporation step.

Table 2 Results of mean droplet size, polydispersity index and zeta potential for TTO-nanoemulsions

Formulation	Tween [®] 80 (V/V, %)	Pluronic [®] F68 (V/V, %)	Mean droplet size (nm ± S.D.)	PDI ± S.D.	ζ-potential (mV ± S.D.)
NE-TTO-TW	0.5	-	111 ± 1	0.5 ± 0.03	-13 ± 2.0
NE-TTO-TW	1.0	-	75 ± 4	0.4 ± 0.01	-15 ± 3.9
NE-TTO-TW	1.5	-	146 ± 3	0.5 ± 0.01	-16 ± 2.6
NE-TTO-PLU	-	0.5	145 ± 1	0.2 ± 0.02	-30 ± 0.9
NE-TTO-PLU	-	1.0	172 ± 4	0.2 ± 0.04	-35 ± 1.1
NE-TTO-PLU	-	1.5	146 ± 1	0.1 ± 0.01	-38 ± 0.6

PDI= polydispersity index; NE-TTO-TW= Tween[®] 80-based nanoemulsions; NE-TTO-PLU= Pluronic[®]-based nanoemulsion.

3.2.2 Nanocapsule preparation

The effect of the type of polymer on size particle, PDI and zeta potential was considered during the preparation of NCs. Eudragit[®] RS100 (NC-EUD) and PCL (NC-PCL) were selected as polymers due to their high biocompatibility (DALCIN et al., 2017; DASH; KONKIMALLA, 2012). The physicochemical characteristics of the developed formulations are presented in Table 3. The NC-EUD presented significantly lower mean particle size and PDI than NC-PCL ($p < 0.05$), which was attributed to the difference in interfacial tension between the two polymers in the solution. Eudragit[®] RS100 presents low interfacial tension due to the ionization of hydrophilic quaternary ammonium groups present in its structure (CHERNYSHEVA et al., 2003). The methacrylate ammonium polycationic polymers (Eudragit[®] RS100) led to positively charged (+33 mV) nanoparticles, while PCL polymer led to negative zeta potential values (-22 mV). Other studies with Eudragit[®] RS100 resulted in similar results (CHAVES et al., 2017; SANTOS et al., 2013; SCHAFFAZICK et al., 2006). Ourique et al. (JÚLIA et al., 2017), for example, observed an average particle diameter of less than 200 nm, low polydispersity index and a positive zeta potential value (+13 mV) for Eudragit[®] RS100 nanocapsules (JÚLIA et al., 2017). This positive charge of particles may also maximize cellular uptake of the drug-polymer complex. Based on these findings, Eudragit[®] RS100 was selected as wall material (DILLEN et al., 2006). The TTO content after optimal NC

preparation was $97.1 \pm 0.6\%$, following the results of Flores et al. (FLORES et al., 2011) Approximately 3% of the oil was lost during preparation, for the reasons mentioned above.

Table 3 Results of mean particle size, polydispersity index and zeta potential for TTO-nanocapsules.

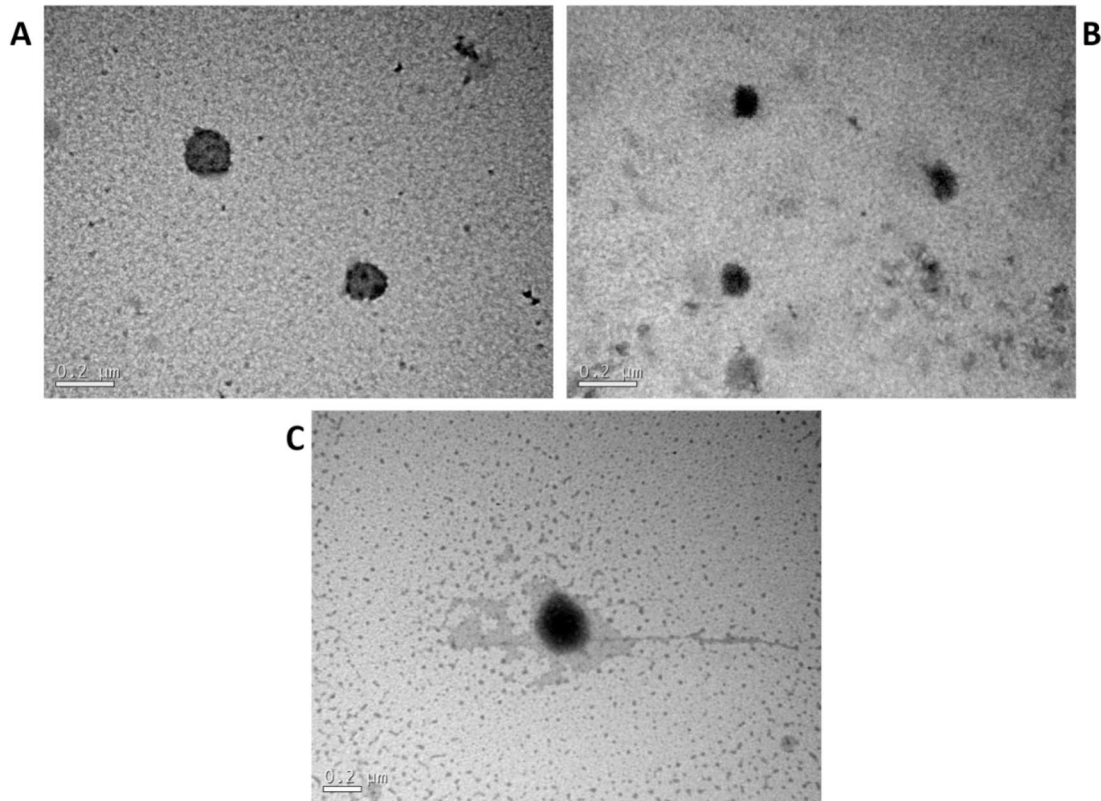
Formulation	Mean droplet size (nm \pm S.D.)	PDI \pm S.D.	ζ -potential (mV \pm S.D.)
NC-TTO-EUD	197 ± 0.2	0.1 ± 0.1	$+33 \pm 0.5$
NC-TTO-PCL	335 ± 1.0	0.2 ± 0.9	-22 ± 0.3

PDI= polydispersity index; NE-TTO-EUD= Eudragit[®] RS100-based nanoemulsions; NE-TTO-PCL= Poly(ϵ -caprolactone)-based nanoemulsion.

3.2.3 TEM analyses

TEM analysis showed homogeneous and spherical droplets for TTO-loaded nanoemulsions (A) and blank nanoparticles (C) (Figure 1). On the other hand, a heterogeneous structure with a nucleus surrounded by an outer layer was observed for nanocapsules (B), consisting of a drop of oil probably surrounded by a polymeric layer. All systems (NC-TTO, NE-TTO and BN) presented particle diameter values similar to those determined by photon correlation spectroscopy (Table 2 and 3).

Figure 1 TEM observations for blank nanoparticles (A), TTO-nanoemulsions (B) and TTO-nanocapsules (C) negatively stained with 0.5 % phosphotungstic acid.



3.3 PHYSICOCHEMICAL STABILITY STUDIES

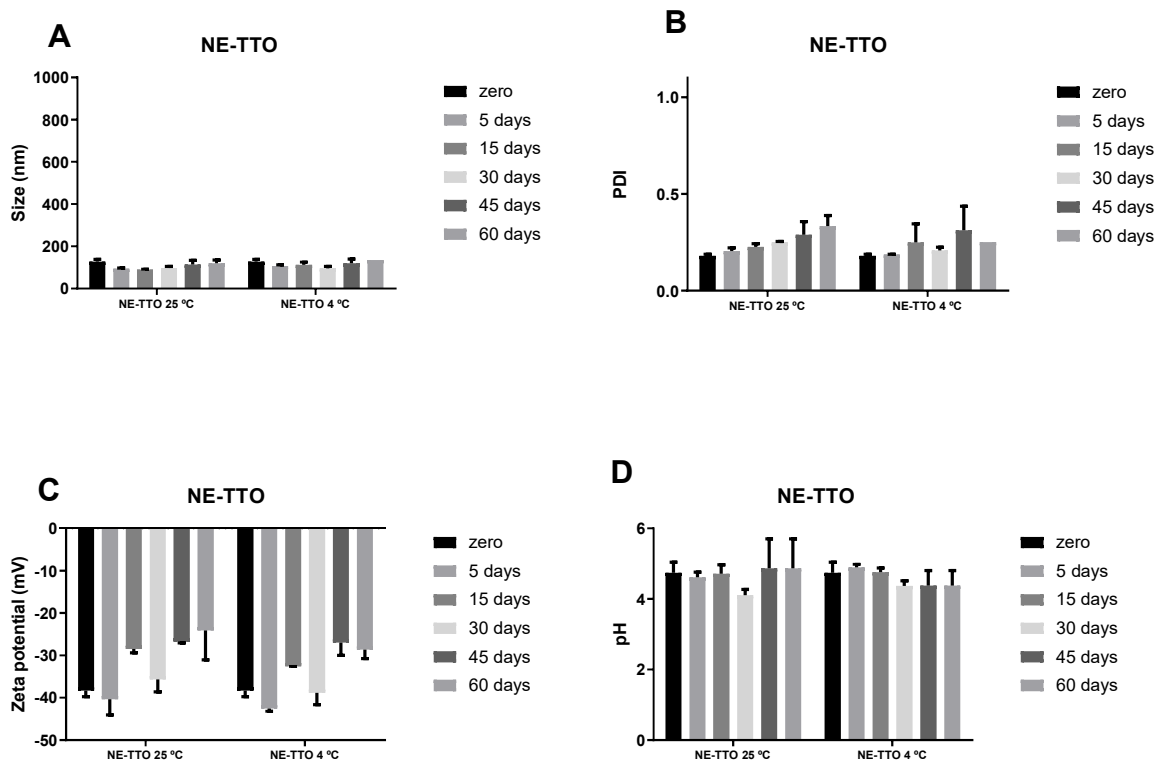
The stability of the formulation during storage is an important parameter to consider in the development of new drug delivery systems. Variables such as adsorption of the active compounds on the surface of the systems, presence of adsorbed surfactants, particle aggregation, chemical instability of the polymer or actives and the premature release of the active agents can all affect the stability of these systems. (SCHAFFAZICK et al., 2006) The physical stability of the formulations was evaluated through analysis of particle size, PDI, zeta potential and pH immediately and 5, 15, 30, 45 and 60 days after preparation (4 °C, 25 °C and light) (Fig. 2, 3 and 4). Particle size and PDI analysis were considered as indicative of the presence of aggregates, while changes in zeta potential and pH as indicative of chemical degradation (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

No macroscopic changes in color, odor or phase separation phenomena were found for NE-TTO and NC-TTO after 60 days. On the other hand, BN showed fungal growth after 15 days (Fig. 4), which may be attributed to the absence of TTO in the systems. As already

reported, TTO has various biological properties, including antimicrobial action (YADAV et al., 2017).

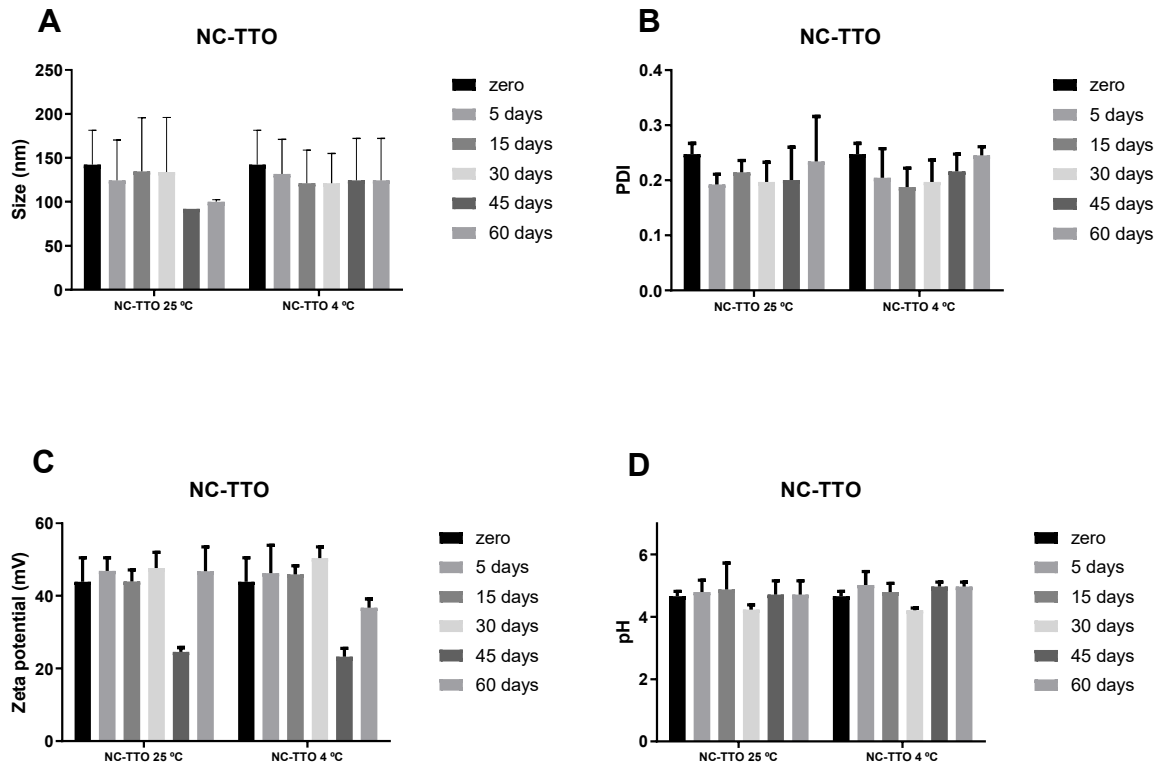
For NC-TTO and NE-TTO stored at 4 °C and 25 °C, no significant differences in physicochemical parameters were observed over time (Figure 2 and 3). Therefore, kinetically stable colloidal suspensions were obtained. These findings can be attributed mainly to the small particle size, which contributes to the prevention of droplet flocculation and coalescence (ANTON; VANDAMME, 2011).

Figure 2 Particle size (A), polydispersity index (B), zeta potential (C) and pH (D) of nanoemulsion containing tea tree oil after 5, 15, 30 and 60 days of storage at 4 °C or 25°C (n=3).



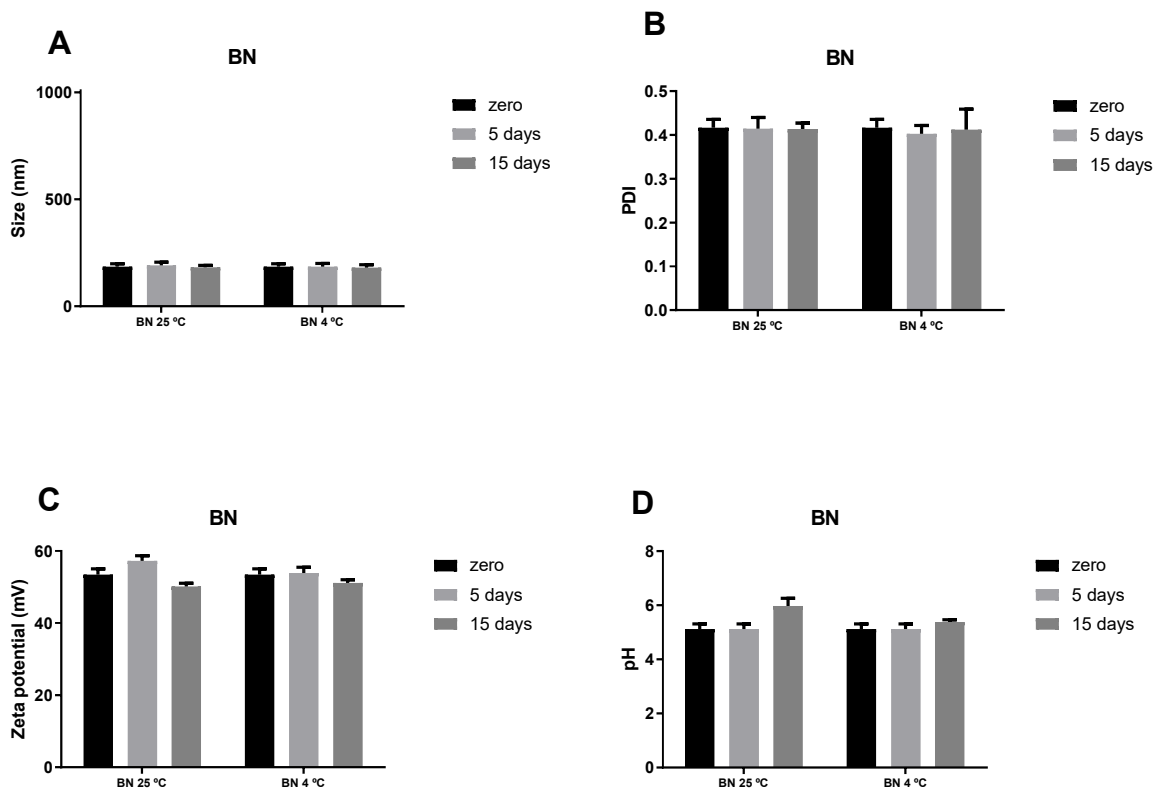
Student's t-test was used to compare each treatment with the control. $p < 0.05$

Figure 3 Particle size (A), polydispersity index (B), zeta potential (C) and pH (D) of nanocapsules containing tea tree oil after 5, 15, 30 and 60 days of storage at 4 °C or 25° (n=3).



The student's t-test was used to compare each treatment with the control. $p < 0.05$

Figure 4 Particle size (A), polydispersity index (B), zeta potential (C) and pH (D) of blank nanoparticles after 5 and 15 days of storage at 4 °C or 25°C (n=3).



The student's t-test was used to compare each treatment with the control. $p < 0.05$

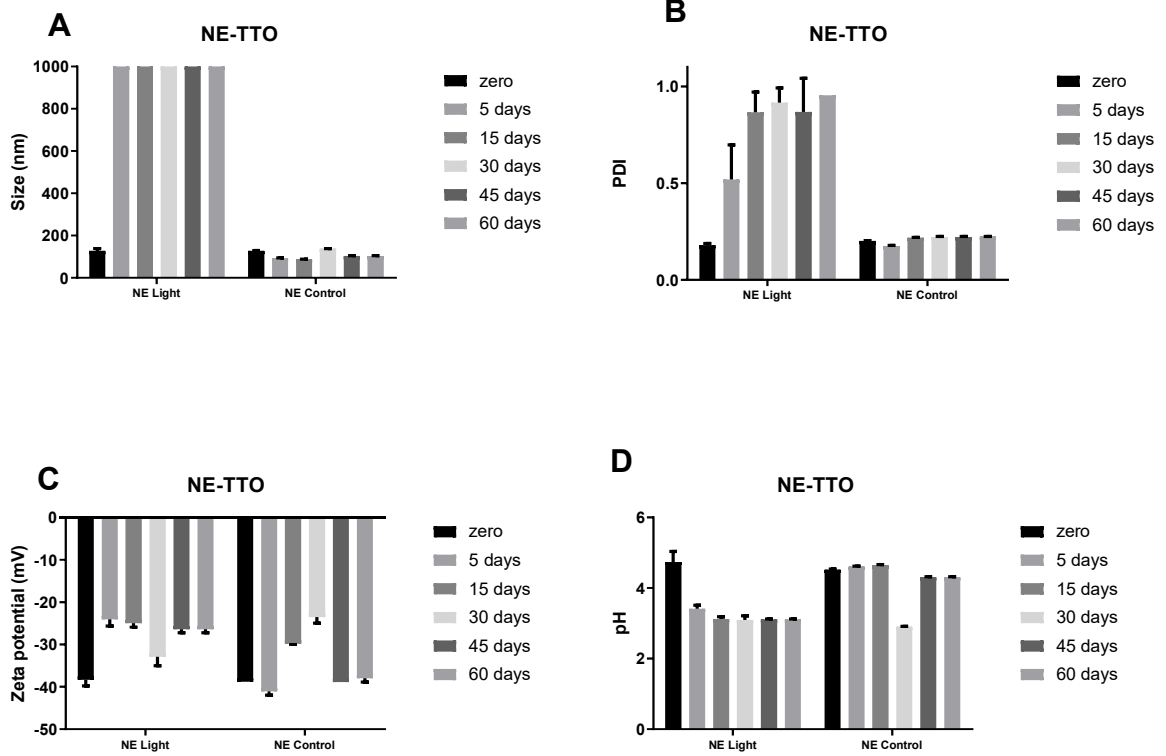
3.3.1 Photostability study

NE-TTO showed significant changes in particle size, PDI, zeta potential and pH after exposure under a UVC artificial lamp for 5 days (Fig. 5). Although NEs are characterized by high stability, instability phenomena such as flocculation, mostly followed by coalescence and Ostwald ripening, may be observed after long-term storage (BRUXEL et al., 2012b). These phenomena may directly impact the *in vivo* performance of the formulations due to the formation of larger and more heterogeneous droplets with a reduced surface area and, consequently, a higher polydispersity index (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; GHOSH et al., 2012). Instability phenomena are often related to physical or chemical changes in surfactants. These agents cover the droplet surface, stabilizing the nanoparticles in suspension through steric repulsion mechanisms (GHOSH et al., 2012; WANG et al., 2013). A reduction in pH of a nanoemulsion may indicate the presence of free fatty acids in the external phase,

resulting from the hydrolysis of the phospholipid surfactants (BRUXEL et al., 2012b). Lecithin is known to degrade upon exposure to air and light, reducing the Ph (HAIDAR et al., 2017). The main consequence of this degradation is a reduction in its stabilizing potential, corroborating the results already discussed above. A reduction in the zeta potential of NE-TTO was also observed from day 5, indicating stability problems.

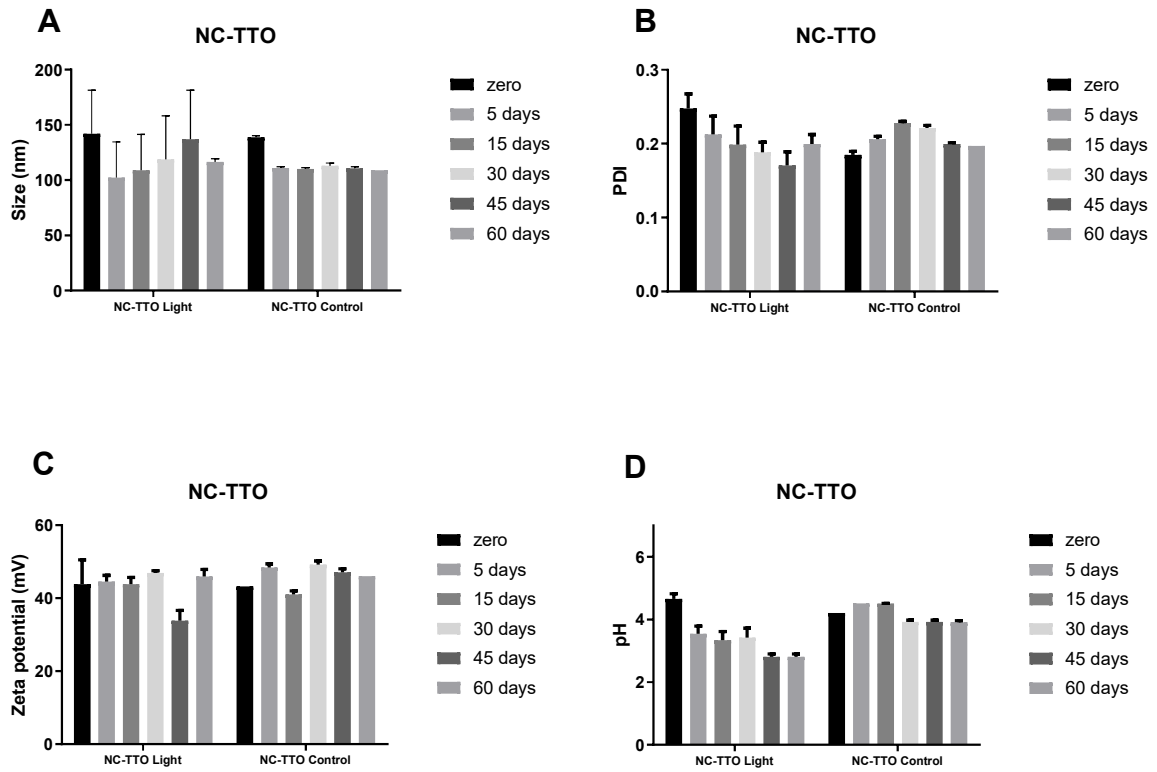
In contrast, the nanocapsules (Fig. 6) did not show changes in particle size, polydispersity index or zeta potential; however, a reduction in pH was found. The crystallinity of the coating polymer may explain these result, as it presents the ability to reflect and scatter UV radiation (OURIQUE et al., 2008; PERUGINI et al., 2002). The significant reduction in the pH values of NC-TTO, from 4.67 at the start of the assay to 2.82 at the end of the assay, can be attributed to the relaxation of the polymer chains. Lopes et al (2000) also obtained similar conclusions for nanocapsules prepared with acrylates. This pH reduction was attributed to the dissociation of polymer carboxylic groups. Given that the particle size and polydispersity index remained unchanged throughout the study, and no exudates or evidence of phase separation were observed, this reduction in pH did not affect the NC-TTO stability.

Figure 5 Particle size (A), polydispersity index (B), zeta potential (C) and pH (D) of nanoemulsion containing tea tree oil after 5, 15, 30 and 60 days of exposure to UVC (n=3).



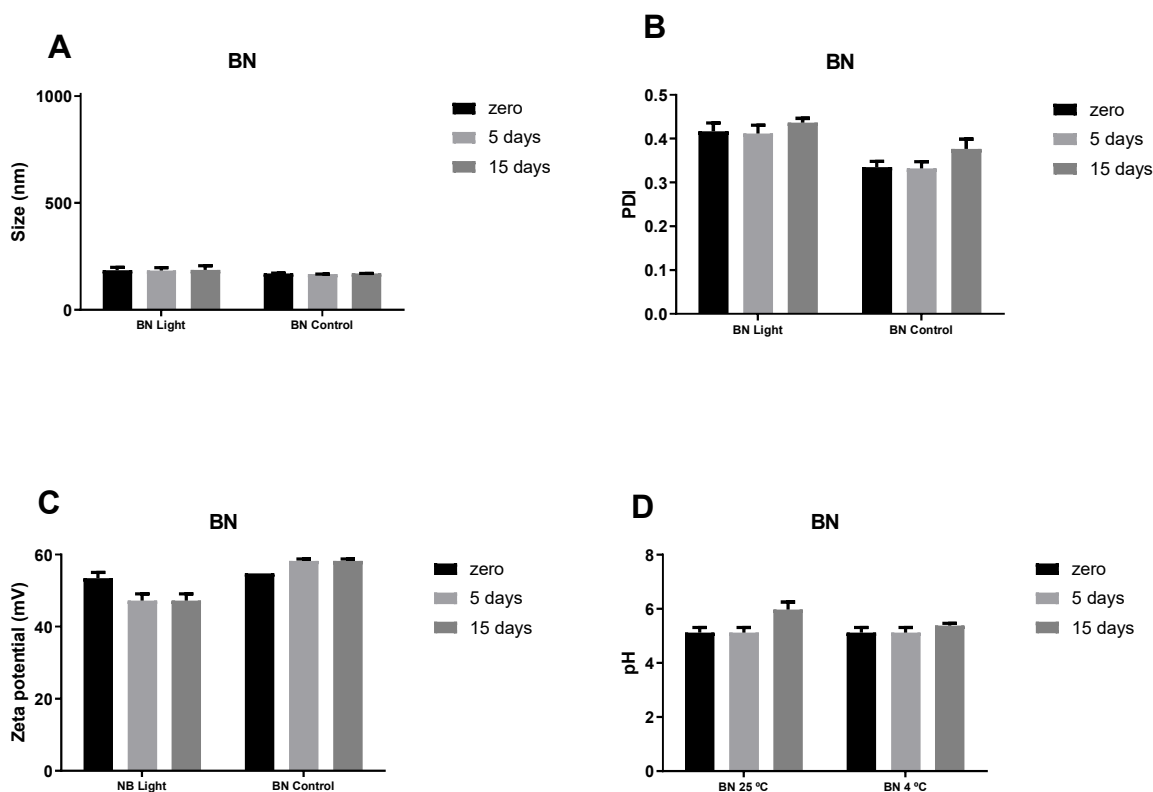
The student's t-test was used to compare each treatment with the control. $p < 0.05$

Figure 6 Particle size (A), polydispersity index (B), zeta potential (C) and pH (D) of nanocapsules containing tea tree oil after 5, 15, 30 and 60 days of exposure to UVC (n=3).



The student's t-test was used to compare each treatment with the control. $p < 0.05$

Figure 7 Particle size (A), polydispersity index (B), zeta potential (C) and pH (D) of blank nanoparticles after 5, 15, 30 and 60 days of exposure to UVC (n=3).



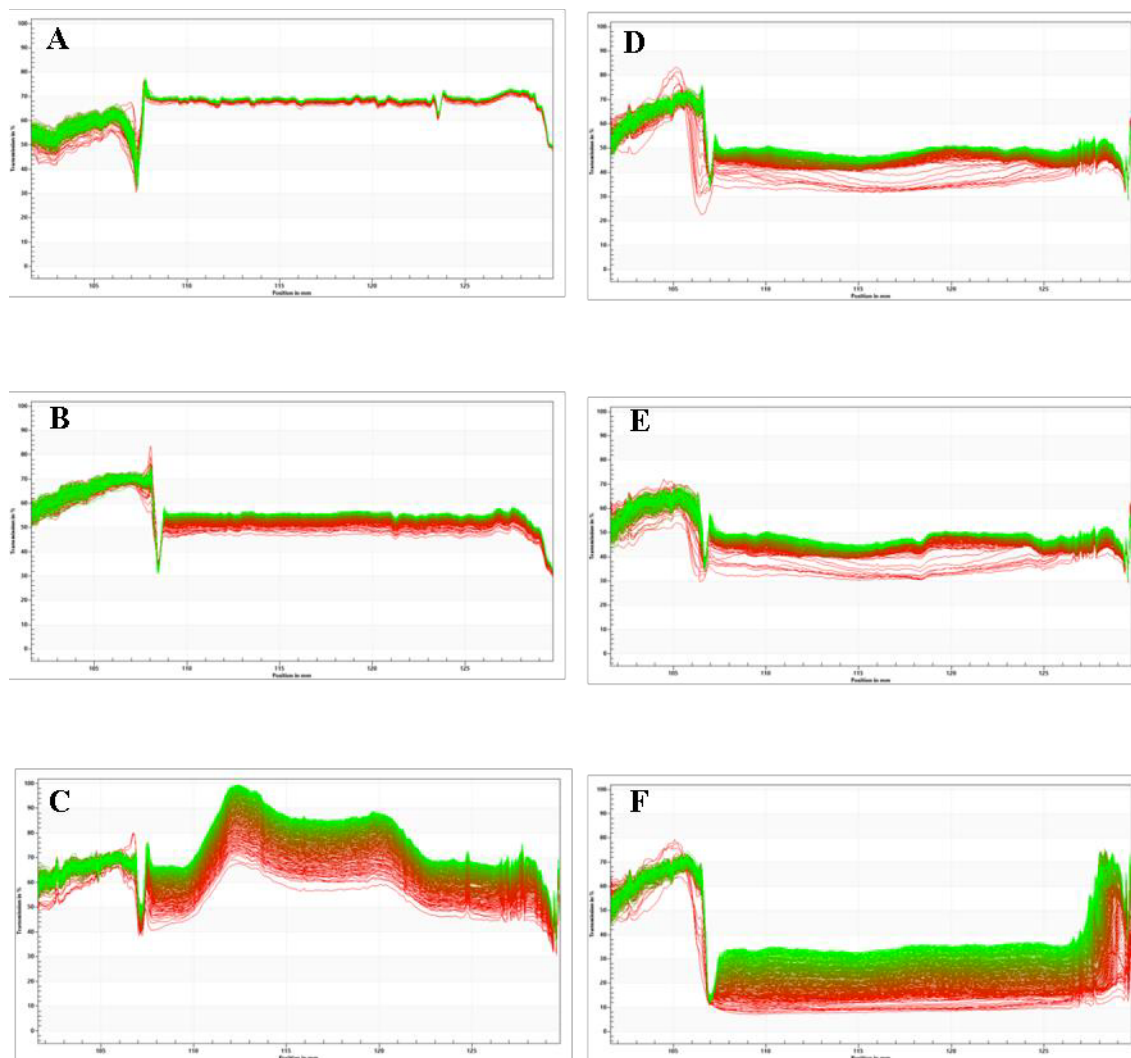
The student's t-test was used to compare each treatment with the control. $p < 0.05$

3.4 ACCELERATED STABILITY

The high stability of NE-TTO and NC-TTO, when stored at 4 °C and 25 °C, was also confirmed by accelerated stability studies using LUMiSizer. This instrument uses a method that allows rapid stability ranking and shelf-life estimation of undiluted dispersion at their original concentrations, in minutes/hours instead of months/years. (CADDEO et al., 2013; DETLOFF; SOBISCH; LERCHE, 2006) The instability was determined in the LUMiSizer by measuring the light transmittance, and results were expressed as an instability index. The instability index is a value of between 0 and 1, where 0 is stable above the level of light transmission and 1 represents complete phase separation, thus exhibiting the lowest stability in centrifugal force. (HONG et al., 2018) In this assay, the instability indices obtained for NE-TTO, NC-TTO and NB-TTO at 4 °C were 0.259, 0.276 and 0.429, respectively. The corresponding instability

indices at 25 °C were 0.099, 0.205 and 0.669 for NE-TTO, NC-TTO and NB-TTO, respectively. The lower instability index obtained for NE-TTO and NC-TTO indicated that the presence of TTO contributes to the physical stabilization of colloidal dispersion. Figure 8 illustrates the representative light transmission profiles averaged over the height of the samples for NB, NE-TTO and NC-TTO at 4 °C and 25 °C, respectively. The greater the shift of the line red with the line green (transmission profiles) the lower the stability of the emulsion. The red line was the first recorded profile, which then shifted into the green line during the measurements (CHEN et al., 2016a). The light transmission profiles of the NB revealed a clarification area with an increase in light transmission, possibly due to initial flocculation.

Figure 8 Light transmission profiles through the cell of samples, stored at 4 °C and 25 °C, subjected to centrifugation at. (A) NE-TTO at 4 °C; (B) NC-TTO at 4 °C; (C) NB at 4 °C; (D) NE-TTO at 25 °C; (E) NC-TTO at 25 °C; (F) NB at 25 °C.



NE-TTO: TTO-nanoemulsions; NC-TTO: TTO-nanocapsules; NB: nanoparticles blanks

3.5 CYTOTOXICITY ASSAY

The cytotoxicity of free TTO, NE-TTO, NC-TTO and BN on RAW 264.7 (murine macrophages) and HEK 293 (human embryonic kidney) cells was evaluated using the sulforhodamine B assay (CHEN et al., 2016; SELVARAJ et al., 2014). BN did not show any cytotoxicity at any of the concentrations tested. On the other hand, free TTO, NE-TTO and NC-TTO reduced viable cells of RAW 264.7 and HEK 293 at the highest concentration tested in both incubation times (Table 4). The reduction in cell viability of NE-TTO, NC-TTO and free

TTO demonstrated that the toxicity is related to TTO, given that that BN did not show a reduction in cell viability. Soderberg et al. (1996) evaluated the cytotoxicity of TTO in human epithelial and fibroblasts cells and observed a 60% reduction in cell viability at concentrations higher than 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The lipophilic character of oil could increase the interaction with the cell membranes, disrupting these structures. NE-TTO and NC-TTO demonstrated a slight increase and reduction in cytotoxicity when compared to free TTO, respectively. NEs are often characterized by a greater affinity for cell membranes, which may explain these findings (BRUXEL et al., 2012a).

Table 4 Cytotoxicity of NE-TTO, NC-TTO, BN and TTO free in RAW and HEK cells.

Cells	Incubation time (h)	IC ₅₀ $\mu\text{g/mL}$ (CI 95%)			
		NE-TTO	NC-TTO	BN	TTO
RAW	24	338.0 (240.4 to 475.2)	648.2 (382.6 to 1098)	>1500	525.3 (386.4 to 714.2)
	48	420.7 (200.1 to 884.5)	548.8 (277.1 to 1234)	>1500	467.2 (302.6 to 721.2)
HEK	24	416.9 (255.8 to 679.3)	364.2 (233.6 to 568.7)	>1500	532.0 (356.8 to 793.4)
	48	353.3 (219 to 568.6)	789.0 (457.0 to 1362)	>1500	407.6 (281.3 to 590.5)

NE-TTO: TTO-nanoemulsions; NC-TTO: TTO-nanocapsules; BN: blank nanoparticles; CI 95%: 95% confidence intervals; IC₅₀: concentration required to reduce viability by 50%.

3.6 BIOCHEMICAL MEASUREMENTS

Oxidative stress plays a key role in inflammation and cellular damage in the pathogenesis of sepsis (CASSOL-JR et al., 2010). The pro-inflammatory effects of reactive oxygen species (ROS) include endothelial damage, formation of chemical factors, neutrophil recruitment and cytokine release (ANDRADES et al., 2011). The organs most affected by sepsis are the lungs, abdomen, kidneys. Therefore, the effect of acute administration of TTO-nanoparticles on oxidative parameters was evaluated here.

3.6.1 Myeloperoxidase activity in lungs and kidney

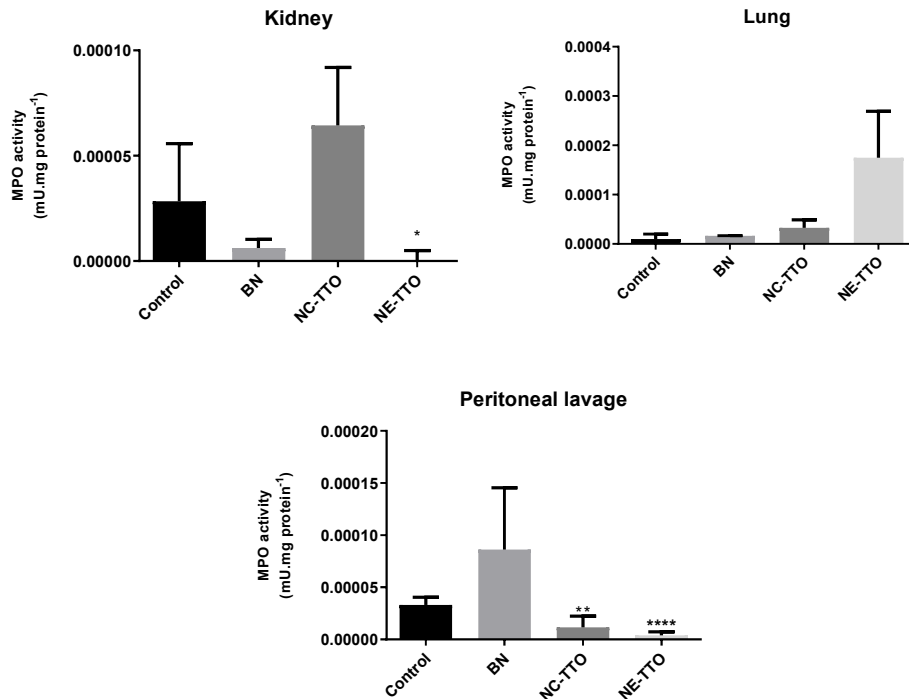
Myeloperoxidase activity (MPO) was evaluated, as it is an indicator of neutrophil infiltration. In the lungs, groups treated with NE-TTO, NC-TTO or BN presented similar

behavior to the control group (saline). Studies in the literature suggest that lung injury is not developed when CLP is used (DOUGHTY et al., 2011; ISKANDER et al., 2013; LOMAS-NEIRA et al., 2006, 2004).

MPO activity in peritoneal lavage was significantly lower with NE-TTO ($p<0.0001$) and NC-TTO ($p<0.05$). CLP is a well-established model of polymicrobial sepsis able to mimic diseases such as ruptured appendicitis or perforated diverticulitis (ANDRADES et al., 2011). As the treatment is carried out directly in the peritoneal cavity, NE-TTO and NC-TTO do not need to diffuse across the peritoneal membrane to reach the focus of infection (CORIA-AVILA et al., 2007).

The MPO activity of NE-TTO in kidneys was also statistically significant ($p<0.0001$; Fig. 5). Overall, oxidative injury of these tissues was accompanied by neutrophil infiltration and was suppressed by treatment with NE-TTO and NC-TTO. These data suggest that sepsis-induced oxidative injuries in these tissues are neutrophil-dependent and are reversible events. Caldefie-Chézet et al. (2004) also evaluated the oxidative response of free TTO. In this study, the role of TTO as a modulator of leukocytes (monocytes and neutrophils) was investigated in an *in vitro* model. The authors demonstrated that TTO reduced the intracellular production of ROS-dependent neutrophils.

Figure 9 Effects of nanoparticles containing TTO on myeloperoxidase activity (MPO) in peritoneal lavage, lung and kidney by considering the *in vivo* cecal ligation and puncture model.

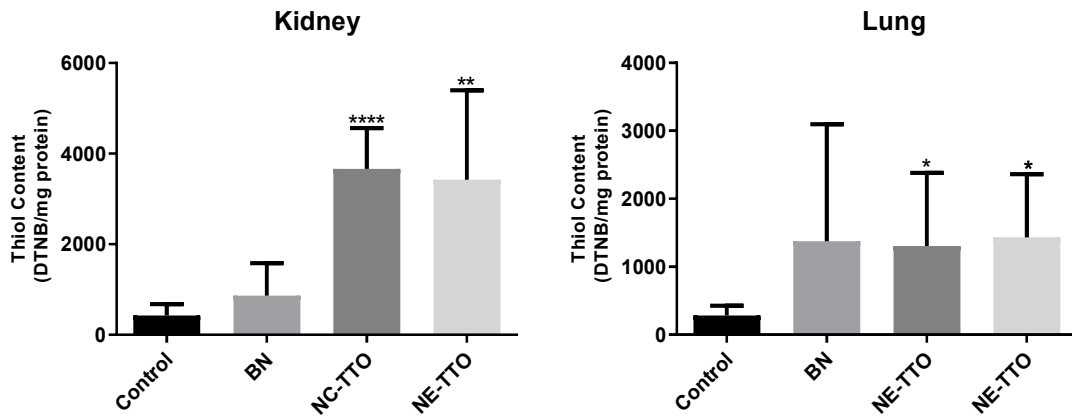


Data are expressed as mean \pm standard error of mean ($n=5$). The student's t-test was used to compare each treatment with the control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$

3.6.2 Measurement of sulfhydryl content

The content of sulfhydryl represents a non-enzymatic antioxidant defense that is inversely correlated with oxidative damage to proteins (TÜRCK et al., 2020). Thus, it may be used as an indicator of non-enzymatic antioxidant activity and represents a barrier to oxidative stress. High levels of free sulfhydryl groups (R-SH) may be a reflection of a favorable redox status, as they avidly interact with ROS and other reactive species (BANNE; AMIRI; PERO, 2003). In the present study, a significant increase in sulfhydryl groups was observed in the renal and lung tissues of animals treated with NE-TTO and NC-TTO when compared to the control group (saline) ($p < 0.05$) (Figure 6). These results suggest a reestablishment of the antioxidant defenses in the tissues of the treated animals. (LEE et al., 2017)

Figure 10 Effects of nanoparticles containing TTO on the oxidation of sulfhydryl groups in the lung and kidneys by considering the *in vivo* CLP model.

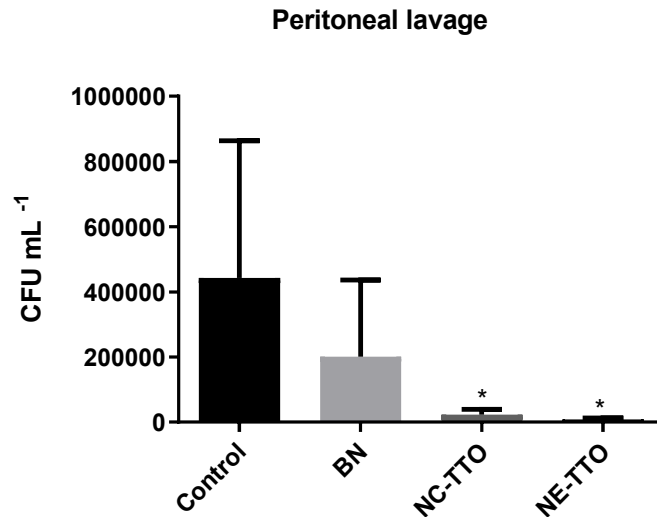


Data are expressed as mean \pm standard error of mean ($n=5$). The student's t-test was used to compare each treatment with the control. * $p < 0.05$ and **** $p < 0.0001$

3.6.3 Antibacterial activity

The use of essential oils as antimicrobial agents is highly recommended as they reduce the chances of developing microbial resistance (NAJAFI-TAHER et al., 2018). The mechanisms and targets of action of essential oils are mostly associated with the cell membrane, including electron transport and ion gradient, protein translocation, and phosphorylation (BURT, 2004; DORMAN; DEANS, 2000). In this study, NE-TTO and NC-TTO provided significant antibacterial effects. In the peritoneal lavage of the animal group treated with NE-TTO and NC-TTO, the bacterial growth was lower than that of the control (saline) (Figure 7). Santos et al. (2014) evaluated the *in vitro* antimicrobial activity of tea tree oil (TTO) nanoparticles against *P. larvae* and *M. plutonius* strains and nanoparticles-TTO. The authors also observed increased antimicrobial activity when TTO was incorporated into the nanoparticles.

Figure 11 Effects of nanoparticles (with and without TTO) on bacterial growth in peritoneal lavage.



Data were expressed as mean \pm standard deviation; The student's t-test was used to compare each treatment with the control * $p < 0.05$.

4 CONCLUSIONS

NEs stabilized with Pluronic[®] and lecithin were more homogeneous (low PDI values) and presented greater physical-chemical stability (high zeta potential $> -30\text{mV}$) than particles prepared with Tween[®] 80 and lecithin. In addition to reduced particle size, Eudragit[®] RS100-based NCs proved to be more homogeneous and stable than poly- ϵ -caprolactone-based NCs. Both optimal colloidal suspensions (NC-TTO and NE-TTO) were considered kinetically stable in accelerated stability studies performed at 4 °C and 25 °C. In contrast, NC-TTO provided greater stability to photodegradation than NE-TTO. The NC polymer acts as a wall material, reducing the degradation of lecithin after exposure to UVC radiation. NC-TTO also showed less *in vitro* cytotoxicity than NE-TTO and free TTO. The small particle size and lipid composition of NEs facilitate interaction with the cell membrane, contributing to greater cytotoxicity. After sepsis induction by the cecal ligation and puncture (CLP) model, NE-TTO and NC-TTO reduced neutrophil infiltration levels in peritoneal lavage and kidney. Moreover, the systems increased group thiols in the kidney and lungs and reduced the bacterial growth in the peritoneal lavage. Although both colloidal systems have been effective against injury induced by sepsis, NC-TTO should be selected, primarily due to its advantages in terms of cytotoxicity and physicochemical stability.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the Brazilian governmental agencies CNPq/MCTI and CAPES/MEC for providing financial support for this project and for the student scholarships. The authors would also like to thank the LCME-UFSC for its technical support during the TEM analyses, and Laboratory of Applied Virology, for the cytotoxicity analyses.

5 REFERENCES

AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, n. 2–3, p. 141–145, abr. 2001.

ANDRADES, M. et al. Antioxidant treatment reverses organ failure in rat model of sepsis: Role of antioxidant enzymes imbalance, neutrophil infiltration, and oxidative stress. **Journal of Surgical Research**, v. 167, n. 2, p. e307–313, maio 2011.

ANTON, N.; BENOIT, J.-P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, p. 185–199, jun. 2008.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and micro-emulsions: Clarifications of the critical differences. **Pharmaceutical Research**, v. 2, p. 180–187, maio 2011.

BANNE, A. F.; AMIRI, A.; PERO, R. W. Reduced Level of Serum Thiols in Patients with a Diagnosis of Active Disease. **Journal of Anti-Aging Medicine**, v. 6, n. 4, p. 327–334, agosto 2003.

BATTISTI, M. A.; CAON, T.; CAMPOS, A. M. A Short review on the antimicrobial micro- and nanoparticles loaded with *Melaleuca alternifolia* essential oil. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 8, n. 4, p. 102283, dez. 2020.

BROPHY, J. J. et al. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 5, p. 1330–1335, set. 1989.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Quimica Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, ago. 2004.

CAO, C.; YU, M.; CHAI, Y. Pathological alteration and therapeutic implications of sepsis-induced immune cell apoptosis. **Nature Publishing Group**, v. 37, n. 5, p. 1330–1335, out. 2019.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50–62, 1 jan. 2006.

CASSOL-JR, O. J. et al. Treatment with cannabidiol reverses oxidative stress parameters, cognitive impairment and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture. **Brain Research**, v. 1348, p. 128–138, ago. 2010.

CHAVES, P. DOS S. et al. Carvedilol-loaded nanocapsules: Mucoadhesive properties and permeability across the sublingual mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 114, p. 88–95, maio 2017.

CHEN, L. et al. Exposure of the murine RAW 264.7 macrophage cell line to dicalcium silicate coating: assessment of cytotoxicity and pro-inflammatory effects. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 27, n. 3, p. 1–11, mar. 2016.

CHERNYSHEVA, Y. V. et al. Effect of the type of hydrophobic polymers on the size of nanoparticles obtained by emulsification-solvent evaporation. **Mendelev Communications**, v. 13, n. 2, p. 65–67, 2003.

CORIA-AVILA, G. A. et al. Cecum location in rats and the implications for intraperitoneal injections. **Lab Animal**, v. 36, n. 7, p. 25–30, jul. 2007.

DALCIN, A. J. F. et al. Anti biofilm effect of dihydromyricetin-loaded nanocapsules on urinary catheter infected by *Pseudomonas aeruginosa*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 156, p. 282–291, ago. 2017.

DASH, T. K.; KONKIMALLA, V. B. Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: **A review Journal of Controlled Release**, v. 37, n. 5, p. 100–135, fev. 2012.

DE YOUNG, L. M. et al. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v. 26, n. 3–4, p. 335–341, mar. 1989.

DELANO, M. J.; WARD, P. A. The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. **Immunological Reviews** v. 41, n. 1, p. 159–170, jan. 2013.

DILLEN, K. et al. Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit® RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, n. 1, p. 72–82, maio 2006.

DORMAN, H. J.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308–16, fev. 2000.

DOUGHTY, L. A. et al. Shock-Induced Neutrophil Mediated Priming for Acute Lung Injury in Mice. **The American Journal of Pathology**, v. 161, n. 6, p. 2283–2294, fev 2011.

DRYDEN, M. .; DAILLY, S.; CROUCH, M. A randomized, controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization. **Journal of Hospital Infection**, v. 56, n. 4, p. 283–286, abr. 2004.

FLORES, F. C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Quimic. Nova**. v. 41, n. 1, p. 159–170, jan. 2015.

FRACASSO, R. et al. Evaluation of potential acute cardiotoxicity of biodegradable nanocapsules in rats by intravenous administration. **Toxicology Research**, v. 5, n. 1, p. 168–179, out. 2015.

GAROZZO, A. et al. Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on Influenza virus A/PR/8: Study on the mechanism of action. **Antiviral Research**, v. 89, n. 1, p. 83–88, jan 2011.

GHOSH, I. et al. Optimization of formulation and process parameters for the production of nanosuspension by wet media milling technique: Effect of Vitamin e TPGS and nanocrystal particle size on oral absorption. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 4, p. 718–728, nov. 2012.

Haidar, I. et al. The role of lecithin degradation on the pH dependent stability of halofantrine encapsulated fat nano-emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 528, n. 1–2, p. 524–535, ago. 2017.

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

HAMMER, K. A. Treatment of acne with tea tree oil (*Melaleuca*) products: A review of efficacy, tolerability and potential modes of action. **International Journal of Antimicrobial Agents** v. 41, n. 1, p. 159–170, fev. 2015.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 4, p. 853–860, out. 2003.

ISKANDER, K. N. et al. Cecal ligation and puncture-induced murine sepsis does not cause lung injury. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 1, p. 159–170, jan. 2013.

JUMAA, M.; MÜLLER, B. W. *In vitro* investigation of the effect of various isotonic substances in parenteral emulsions on human erythrocytes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 2, p. 207–212, dez. 1999.

LEE, M. T. et al. Antioxidant capacity of phytochemicals and their potential effects on oxidative status in animals - A review **Journal of Animal Sciences**, v. 13, n. 2, p. 165–167, mar. 2017.

LOMAS-NEIRA, J. et al. Role of alveolar macrophage and migrating neutrophils in hemorrhage-induced priming for ALI subsequent to septic challenge. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 290, n. 1, p. 51–8, jan. 2006.

LOMAS-NEIRA, J. L. et al. CXCR2 inhibition suppresses hemorrhage-induced priming for acute lung injury in mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 1, p. 58–64, jul. 2004.

LOPES, E. et al. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization. **Die Pharmazie**, v. 55, n. 7, p. 527–30, jul. 2000.

MARQUELE-OLIVEIRA, F. et al. Development of nitrosyl ruthenium complex-loaded lipid carriers for topical administration: improvement in skin stability and in nitric oxide release by visible light irradiation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 4, p. 843–851, dez. 2010.

MILIOLI, M. V. M. et al. The impact of age on long-term behavioral and neurochemical parameters in an animal model of severe sepsis. **Neuroscience Letters**, v. 708, p. 134–139, 24 ago. 2019.

MIRKOVIĆ, D. et al. Evaluation of the impact of critical quality attributes and critical

process parameters on quality and stability of parenteral nutrition nanoemulsions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 39, p. 341–347, 1 jun. 2017.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 113–142, 29 jan. 2010.

NAJAFI-TAHER, R. et al. Promising Antibacterial Effects of Silver Nanoparticle-Loaded Tea Tree Oil Nanoemulsion: a Synergistic Combination Against Resistance Threat. **AAPS PharmSciTech**, v 13, n. 12, p. 65–67, dez 2017.

OURIQUE, A. F. et al. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, n. 1–2, p. 1–4, 20 mar. 2008.

PERUGINI, P. et al. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 246, n. 1–2, p. 37–45, 10 out. 2002.

QUINTANS, J. S. S. et al. Monoterpenes modulating cytokines - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 123, p. 233–257, 1 jan. 2019.

RAMAGE, G. et al. Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: Potential role in management of oral candidosis in cancer patients. **Frontiers in Microbiology**, v 3 n. 2, p. 65–67, jun 2012.

RAVI KUMAR, M. N. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences**, v. 3, n. 2, p. 234–58, out 2018

RITTER, C. et al. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. **Intensive Care Medicine**, v. 29, n. 10, p. 1782–1789, 1 out. 2003.

SANTOS, L. P. DOS et al. Antioxidant polymeric nanoparticles containing standardized extract of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. for topical use. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 738–747, dez. 2017.

SANTOS, S. S. et al. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and in vitro evaluation of antifungal activity against *Candida* species. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 3, p. 1389–1394, abr. 2013.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, p. 562–569, jan 2006.

SELVARAJ, V. et al. Cytotoxicity and genotoxicity caused by yttrium oxide nanoparticles in HEK293 cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 1379–1391, mar. 2014.

SHARMA, A.; MADHUNAPANTULA, S. V.; ROBERTSON, G. P. Toxicological considerations when creating nanoparticle-based drugs and drug delivery systems. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v 8, n. 2, p. 56–67, jan. 2012.

SÖDERBERG, T. A.; JOHANSSON, A.; GREF, R. Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. **Toxicology**, v. 107, n. 2, p. 99–109, mar 1996.

SURH, J.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Utilisation of spontaneous emulsification to fabricate lutein-loaded nanoemulsion-based delivery systems: factors influencing particle size and colour. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 1408–1416, out 2017.

TÜRCK, P. et al. Blueberry extract decreases oxidative stress and improves functional parameters in lungs from rats with pulmonary arterial hypertension. **Nutrition**, v. 70, p. 110579, fev. 2020.

UPPU, D. S. S. M.; GHOSH, C.; HALDAR, J. Surviving sepsis in the era of antibiotic resistance: Are there any alternative approaches to antibiotic therapy? **Microbial Pathogenesis**, v. 13, n. 2, p. 142–147, jan. 2015.

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.

WANG, H.; XU, T.; LEWIN, M. R. Future possibilities for the treatment of septic shock with herbal components **American Journal of Emergency Medicine**, v. 9, n. 2, p. 25–37, jan. 2009.

WANG, J. J. et al. Lipid nanoparticles with different oil/fatty ester ratios as carriers of buprenorphine and its prodrugs for injection. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 2, p. 138–146, set. 2009.

WANG, Y. et al. Stability of nanosuspensions in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 3, p. 1126–1141, dez. 2013.

WONG, Y. F. et al. Enantiomeric distribution of selected terpenes for authenticity assessment of Australian *Melaleuca alternifolia* oil. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 475–483, maio 2015.

YADAV, E. et al. Tea tree oil: a promising essential oil. **Journal of Essential Oil Research**, n. 15, n. 5, p. 300–330, maio 2017

YUAN, F. et al. Impact of High Hydrostatic Pressure on the Emulsifying Properties of Whey Protein Isolate-Chitosan Mixtures. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 4, p. 1024–1031, abr. 2013.

ZHANG, J. et al. Self-assembled nanoparticles based on hydrophobically modified chitosan as carriers for doxorubicin. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 4, p. 258–265, dez. 2007.

ZHANG, X. et al. *In Vitro* Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–8, maio 2018.

CAPÍTULO 3

*Avaliação in vitro da atividade anti-herpética dos sistemas nanoesturados
contendo óleo essencial de Melaleuca alternifolia*

APRESENTAÇÃO

Este capítulo apresenta os resultados da avaliação da atividade anti-herpética das nanoemulsões e nanocápsulas contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, NE-TTO e NC-TTO, preparadas conforme descrito no capítulo 2. O potencial citotóxico e anti-herpético contra o vírus do herpes HSV-1 foi testado em células Vero. Este estudo foi realizado em parceria com a professora Izabella Thais da Silva no Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina.

1 INTRODUÇÃO

O *Herpes Simplex Virus- Tipo 1* (HSV-1) é uma infecção altamente contagiosa, mas raramente fatal, comum e endêmica em todo o mundo, não têm variação sazonal e, naturalmente, infecta apenas seres humanos. Este vírus é geralmente transmitido através do contato com lesões herpéticas, mucosas e secreções orais e pode evoluir para patologias mais graves, como encefalite, ceratite ou gengivostomatite. Além disso, embora o HSV-1 seja causado principalmente por contato oral-oral, ele tem o potencial de ser transmitido por meio do sexo oral, causando uma infecção genital (COLE, 2020; EL-TOUMY et al., 2018; IKAWA et al., 2019).

O HSV-1 é classificado, de acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), como pertencente à ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *α -Herpesvirinae* e gênero *Simplex Virus* (ICTV, 2014). O vírion ou partícula infecciosa apresenta um núcleo contendo DNA de fita dupla, envolvido pelo capsídeo icosaédrico. Em seu contorno há uma camada preenchida com proteínas, denominada tegumento, que por sua vez é envolto por um envelope lipídico com espículas glicoproteicas em sua superfície (WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

A exposição inicial ao HSV-1 leva à invasão viral das células epiteliais e à replicação intracelular no local da exposição primária. Após a infecção primária, o vírus se replica no local da infecção e passa a viajar pelas fibras sensoriais amielínicas até o gânglio trigêmeo, onde estabelece a latência. Os gânglios tornam-se reservatórios para surtos futuros. O período de incubação pode variar de 1 a 26 dias, causando destruição celular e inflamação local resultando em lesões vesiculares eritematosas, que apresentam regressão espontânea. O período de transmissão varia de 4 a 12 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas. Alguns estímulos podem desencadear a reativação do vírus: estresse psicológico ou fisiológico, radiação UVB, trauma, menstruação, sideropenia ou doença febril. A infecção por HSV-1 dura toda a vida (SALEH; SHARMA, 2018).

O tratamento para infecções primárias por HSV-1 geralmente envolve a administração por via oral durante 7 a 10 dias de aciclovir, valaciclovir, penciclovir, fanciclovir, trifluoridina, vidarabina, foscarnet, cidofovir, docosanol, brivudina ou ganciclovir. Com esse tratamento é possível reduzir os sinais e sintomas (DONALISIO et al., 2013).

O mecanismo de ação desses medicamentos é a inibição da síntese de DNA por meio da ação de análogos de nucleosídeos. Alguns destes análogos de nucleosídeos sintéticos, quando aplicados nas etapas primárias da infecção como agentes anti-herpéticos, podem levar

ao surgimento de cepas virais resistentes, principalmente em pacientes com comprometimento imunológico. Portanto, há uma necessidade crescente de encontrar novos compostos antivirais alternativos (BOFF et al., 2020).

Óleos voláteis são promissores como fontes para o desenvolvimento de novos agentes antivirais, uma vez que sintetizam um grande número de compostos químicos com estruturas complexas e, com isso, são uma alternativa para a resistência aos antivirais sintéticos (SCHNITZLER, 2019). Os óleos voláteis exibem propriedades antivirais contra vírus com envelope. Cerca de metade de todos os vírus possuem um envelope, incluindo todos os herpes vírus. Esse envelope consiste em uma bicamada lipídica que contém proteínas virais para fixação de células e circunda o capsídeo viral (ASTANI; REICHLING; SCHNITZLER, 2011).

Schnitzler e colaboradores investigaram a atividade anti-herpética do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. O óleo exibiu altos níveis de atividade virucida contra HSV-1 em testes de suspensão viral. Em concentrações não citotóxicas do óleo, a formação de placas foi reduzida em 98,2 %. Os autores concluíram que a aplicação do óleo como agente antiviral nas infecções recorrentes causadas por HSV-1 é promissora.

Brun e colaboradores (2018), avaliaram a atividade antiviral do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. A atividade contra o vírus HSV-1 foi determinada em células Vero e as concentrações de óleo testadas foram de 2,5, 5 e 10 % V/V. Os autores observaram redução significativa da infecção viral causada por HSV-1 nas células tratadas com o óleo nas concentrações de 5 e 10 % V/V.

A aplicação tópica é a melhor maneira de tratar o herpes labial. Na medicina popular, para o tratamento das infecções herpéticas, os óleos voláteis são usados em formas diluídas para aplicação sobre as lesões. Porém, de maneira geral, óleos voláteis apresentam um potencial significativo de irritação da pele e mucosas (SCHNITZLER; REICHLING, 2011).

O uso combinado de sistemas nanoestruturados com compostos naturais bioativos é muito atraente e vem crescendo nos últimos tempos. A associação de substâncias ativas de origem vegetal, a sistemas coloidais conferem um grande número de vantagens, incluindo o aumento da solubilidade e biodisponibilidade, proteção contra a toxicidade, aumento da atividade farmacológica, aumento da estabilidade, liberação sustentada e proteção contra a degradação física e química, etc (AJAZUDDIN; SARAF, 2010; MITCHELL et al., 2020). Assim, a combinação de sistemas de administração nanoestruturados e óleos voláteis pode ser considerada uma alternativa promissora para contornar os problemas associados aos óleos voláteis no desenvolvimento de novos medicamentos.

As nanoemulsões e nanocápsulas contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, desenvolvidas neste trabalho (Capítulo 2), apresentaram a capacidade de proteger o óleo frente exposição a luz e temperatura. Considerando que a atividade antiviral do óleo já foi amplamente demonstrada em estudos *in vivo* e *in vitro* (GARBER; BARNARD; PICKRELL, 2021), foi considerada a hipótese de que estes sistemas poderiam potencializar a ação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* contra o vírus HSV-1.

Baseado nas considerações acima, este capítulo teve como objetivo avaliar a atividade anti-herpética do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel a partir da associação do óleo aos sistemas nanoestruturados, NE-TTO e NC-TTO, desenvolvidos e caracterizados neste trabalho.

2 MÉTODOS

2.1 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

Nanoemulsões e nanocápsulas contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel foram preparadas por emulsificação espontânea (SURH; DECKER; MCCLEMENTS, 2017) e pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI et al., 1989), respectivamente, conforme descrito no item 2.3 do Capítulo 2. A caracterização físico-química dos sistemas foi realizada a partir da avaliação do tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de óleo (item 2.4, Capítulo 2)

2.2 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Uma alíquota de 100 µL de suspensão de células Vero contendo aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células/mL foi distribuída em placas de 96 cavidades (100 µL/cavidade). A placa foi incubada por 24 h, a 37 °C, em estufa de CO₂ até confluência. O meio (MEM) foi substituído por 200 µL de diferentes concentrações das amostras e a placa foi incubada por 48 h, nas mesmas condições de temperatura e atmosfera. Sem remover o sobrenadante, as células foram fixadas com 100 µL/cavidade de solução aquosa de ácido tricloroacético a 10% (m/v), e a placa foi incubada por 1 h a 4 °C. Após esse período, as cavidades foram lavadas quatro vezes cuidadosamente com água destilada e mantidas em temperatura ambiente para secar (24 h). As células fixadas foram coradas com 100 µL de solução ácida de sulforrodamina B (0,057%, m/v) por 30 min. O excesso de corante foi removido com solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) em quatro lavagens sucessivas e novamente a placa foi mantida em temperatura ambiente. Para extração do corante ligado às proteínas utilizou-se 100 µL/cavidade de solução tampão Tris-Base 10 mM, pH 10,5. A placa foi agitada por 10 min. até que todo corante fosse dissolvido e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 510 nm (Spectra Max M2, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Os valores de absorbância de cada concentração testada foram transformados em percentuais de viabilidade em relação ao controle celular, o qual é considerado 100 % viável, através da fórmula abaixo, em que DO = densidade óptica:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \text{DO}_{\text{amostra}} \times 100 / \text{DO}_{\text{controle celular}}$$

Em seguida, os percentuais calculados referentes às diferentes concentrações das amostras (NE-TTO, NC-TTO, NB ou óleo livre) foram inseridos num gráfico e, por análise de

regressão, foi possível calcular a CC_{50} , ou seja, concentração de cada amostra capaz de reduzir em 50 % a viabilidade celular. Os valores de CC_{50} calculados representam a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão.

2.3 AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL

2.3.1 Ensaio de redução do número de placas de lise

A avaliação da atividade anti-herpética do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e das formulações, preparadas no capítulo 2 deste trabalho, foi realizada utilizando-se o vírus HSV-1 (cepa KOS), através do ensaio de placas de lise e seguiu o procedimento proposto por Silva e colaboradores (2010). Além das amostras (NE-TTO, NC-TTO, NB ou óleo livre), aciclovir foi usado como controle positivo (ACV/Sigma Aldrich) e cada ensaio continha controle viral (células infectadas e não tratadas com as amostras) e controle celular (células não infectadas e nem tratadas). Células Vero foram cultivadas em placas de 24 cavidades (2,5 x 105/cavidade/0,75 mL) e incubadas a 37 °C, 5 % de CO₂ até a confluência (24 h). Após esse tempo, o meio foi aspirado, a monocamada celular foi lavada 3 vezes com PBS e 400 µL das suspensões virais foram adicionados, na concentração de 100 UFP/cavidade, por 1 h a 37 °C e 5 % CO₂. Após a adsorção viral, as células foram lavadas com tampão fosfato PBS e foram adicionados 500 µL de diferentes concentrações de amostra em uma solução de carboximetilcelulose 1,5 % dissolvida em MEM 2x (1:1, v/v) por 48 h, a 37 °C e 5 % CO₂. Por fim, o meio foi aspirado, as células foram coradas com 200 µL de preto de naftaleno. Após 40 min, a temperatura ambiente e em agitador horizontal, o corante foi aspirado e as placas formadas foram contadas através da visualização em microscópio estereoscópio. A porcentagem de inibição da replicação viral de cada amostra, com relação aos controles virais, foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 1 - [\text{n}^\circ \text{ placas amostra} / \text{n}^\circ \text{ placas controle viral}] \times 100$$

Os percentuais calculados foram inseridos em gráficos e, através da análise de regressão, foi possível calcular os valores de CI_{50} , concentração de cada amostra que inibiu 50 % a infecção viral. Os valores de CI_{50} representam a média de, no mínimo, três experimentos independentes \pm desvio padrão. Com posse dos valores de CC_{50} e CI_{50} foi possível calcular o índice de seletividade ($IS = CC_{50}/CI_{50}$) de cada amostra, em relação à cepa viral utilizada. Os valores de IS indicam o quanto a atividade antiviral de cada material testado pode ser promissora, ou seja,

quanto maior for o valor do IS, mais seletivo será o material-teste ao vírus e não à célula hospedeira (COS et al., 2006).

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICA

O tratamento estatístico dos dados obtidos incluiu análise descritiva de variáveis como média, desvio padrão, coeficiente de variação, estudos de correlação, regressão linear simples, teste t de Student, análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

Nanoemulsões e nanocápsulas contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foram preparados por emulsificação espontânea (SURH; DECKER; MCCLEMENTS, 2017) e deposição interfacial de polímero pré-formado nas condições previamente otimizadas. As nanoemulsões e nanocápsulas carregadas com óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* apresentaram diâmetros médios de 146 ± 1 e $197 \pm 0,2$ nm, respectivamente e índice de polidispersão de $0,1 \pm 0,1$ indicando que os sistemas apresentam tamanhos homogêneos. Valores de índice de polidispersão acima de 0,2 indicam uma ampla distribuição (SOUZA et al., 2011). As formulações apresentaram potenciais zeta de $-38 \pm 0,6$ e $+33 \pm 0,5$ mV, respectivamente. O potencial zeta é um importante parâmetro físico-químico que influencia a estabilidade dos sistemas nanoestruturados (CHEN et al., 2014b). O valor do potencial zeta positivo ou negativo em torno de 30 mV produz forças repulsivas maiores. Finalmente, as nanopartículas apresentaram teor de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em torno de $95,2 \pm 0,5$ % para NE-TTO e $97,1 \pm 0,6$ % para NC-TTO da concentração teórica, 5,0 e 5,1 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

3.2 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Para avaliação da atividade antiviral do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e dos sistemas nanoestruturados contendo o óleo, primeiramente foi determinada a concentração capaz de reduzir em 50 % a viabilidade celular (CC_{50}). A linhagem celular Vero é usada extensivamente para estudos de replicação de vírus e ensaios de placas de lise, uma vez que apresenta boa susceptibilidade à infecção pelo HSV-1 (HU; HSIUNG, 1989).

A citotoxicidade do óleo livre, NE-TTO, NC-TTO e nanopartículas brancas (6-1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em células Vero foi avaliada usando o ensaio de Sulforrodamina B por 48 h (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). O óleo livre foi a amostra mais citotóxica para as células Vero (CC_{50} 179,8 $\mu\text{g/mL}$), NE-TTO apresentou efeito citotóxico moderado (CC_{50} 221,4 $\mu\text{g/mL}$), enquanto NC-TTO foi o que se mostrou menos citotóxico (CC_{50} 630,5 $\mu\text{g/mL}$). As nanopartículas brancas apresentaram os menores valores de citotoxicidade em todas as concentrações testadas ($CC_{50} > 1500 \mu\text{g/mL}$). A incorporação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* nos nanossistemas foi capaz de reduzir os efeitos citotóxicos em células Vero, principalmente com NC-TTO. Já foi descrito na literatura que o encapsulamento de compostos bioativos representa uma abordagem viável e eficiente para reduzir a toxicidade. A baixa citotoxicidade é um dos requisitos mais importantes para um agente antiviral (MELÉNDEZ-VILLANUEVA et al., 2019). Conforme encontrado neste estudo, observou-se que, após o encapsulamento, a citotoxicidade do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foi menor, evidenciando o efeito protetor dos nanossistemas. NC-TTO apresentou menor citotoxicidade em comparação a NE-TTO, isso pode ser justificado pelo fato de o óleo não estar totalmente disponível, devido ao revestimento da matriz polimérica (EL-DAIRI; HOUSE, 2019; LUIS et al., 2020).

3.3 ENSAIO DE REDUÇÃO DO NÚMERO DE PLACAS DE LISE

Neste estudo, a atividade anti-herpética do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* livre, NE-TTO, NC-TTO e nanopartículas brancas (25 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi investigada frente à replicação do HSV-1, por meio do ensaio de redução do número de placa viral após 48 h de incubação (SILVA et al., 2010). Os resultados mais promissores foram obtidos com NE-TTO e NC-TTO, apresentando valores de IS de 57,47 e 30,9, respectivamente, e com valores de IC_{50} de 3,48 e 21,28 $\mu\text{g/mL}$. O óleo livre apresentou valores de IS de 10,35 e IC_{50} de 16,99 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Nanopartículas brancas não apresentaram atividade contra a replicação do HSV-1. O índice de seletividade é um parâmetro amplamente utilizado para expressar a eficácia *in vitro* de um composto na inibição da replicação do vírus. O IS é expresso pela razão entre a citotoxicidade e a atividade antiviral. Uma substância ativa ideal deve apresentar baixa citotoxicidade em altas concentrações e atividade antiviral em baixas concentrações, resultando em alto valor de IS. Quanto maior a razão IS, teoricamente mais eficaz e seguro um medicamento seria durante o tratamento *in vivo* para uma determinada infecção viral. O IS foi mais pronunciado após o encapsulamento quando comparado ao óleo livre, o que pode ser explicado pela maior área de contato do NE-TTO e NC-TTO favorecendo a interação com a membrana viral. Os pequenos

tamanhos e grandes áreas superficiais dos sistemas nanoestruturados proporcionam um maior contato com o microrganismo e, portanto, uma deposição de alto teor de óleo em sua superfície. NE-TTO apresentou melhor ação anti-herpética em comparação com NC-TTO. Este resultado pode estar relacionado a uma liberação mais lenta do óleo a partir da NC-TTO, devido aos processos de difusão através da parede do polímero e erosão do polímero como mecanismos de liberação do óleo das nanocápsulas (Tabela 1) (RAMADAN et al., 2020).

Tabela 1 Citotoxicidade em células Vero e atividade antiherpética contra HSV-1 de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel Livre, NE-TTO e NC-TTO

Amostras	CC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/ml)	IS
Óleo de <i>Melaleuca</i>	176,0	16,99	10,35
NE-TTO	200,4	3,49	57,47
NC-TTO	651,0	21,30	30,59

NE-TTO: Nanoemulsões contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*; NC-TTO: Nanocápsulas contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*; Índice de seletividade (IS = CC₅₀/IC₅₀).

Os resultados apresentados neste capítulo, que trata da investigação da atividade anti-herpética das formulações NC-TTO, NE-TTO frente ao HSV-1 em comparação óleo livre demonstraram o aumento da atividade anti-herpética das mesmas em comparação ao óleo, porém maiores informações devem ser averiguadas para dar continuidade ao estudo e viabilizar a aplicação destas formulações.

4 REFERÊNCIAS

ARDUINO, P. G.; PORTER, S. R. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features*. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 37, n. 2, p. 107–121, 26 jul. 2007.

ARDUINO, P. G.; PORTER, S. R. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: Overview on relevant clinico-pathological features. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 45, n. 1, p. 43–51, fev. 2008.

BATTISTI, M. A.; CAON, T.; CAMPOS, A. M. A Short review on the antimicrobial micro- and nanoparticles loaded with *Melaleuca alternifolia* essential oil. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 102283, 9 dez. 2020.

BOFF, L. et al. Elucidation of the mechanism of anti-herpes action of two novel semisynthetic cardenolide derivatives. **Archives of Virology**, v. 165, n. 6, p. 1385–1396, jun. 2020.

CADDEO, C. et al. Nanocarriers for antioxidant resveratrol: Formulation approach, vesicle self-assembly and stability evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, n. 3 p. 327–332, nov. 2013.

CHEN, H. et al. Investigation into the physical stability of a eugenol nanoemulsion in the presence of a high content of triglyceride. **RSC Advances**, v. 6, n. 93, p. 91060–91067, set. 2016.

CHEN, Y. et al. Preparation and characterization of a nanostructured lipid carrier for a poorly soluble drug. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 455, n. 1, p. 36–43, ago. 2014.

COLE, S. Herpes Simplex Virus: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Clinics of North America** v 10, n. 15, p. 112-120, set. 2020.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* —proof-of-concept. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290–302, jan 2006.

DETLOFF, T.; SOBISCH, T.; LERCHE, D. Particle Size Distribution by Space or Time Dependent Extinction Profiles obtained by Analytical Centrifugation. **Particle & Particle Systems Characterization**, v. 23, n. 2, p. 184–187, ago. 2006.

DONALISIO, M. et al. *In vitro* anti-herpes simplex virus activity of crude extract of the roots of *Nauclea latifolia* Smith (rubiaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, out. 2013.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review **Phytotherapy Research** v. 65, n.12 , p. 36–43, abr. 2007.

EL-TOUMY, S. A. et al. Antiviral effect of polyphenol rich plant extracts on herpes simplex virus type 1. **Food Science and Human Wellness**, v. 7, n. 1, p. 91–101, mar. 2018

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 1–4, fev 1989.

FEYAERTS, A. F.; LUYTEN, W.; VAN DIJCK, P. Striking essential oil: tapping into a largely unexplored source for drug discovery. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 1 dez. 2020.

GARBER, A.; BARNARD, L.; PICKRELL, C. Review of Whole Plant Extracts With Activity Against Herpes Simplex Viruses *In Vitro* and *In Vivo*. **Journal of Evidence-Based Integrative Medicine**, v. 26, p. 103-107, jan 2021.

HONG, I. K. et al. The Effect of Alkyl Chain Number in Sucrose Surfactant on the Physical Properties of Quercetin-Loaded Deformable Nanoliposome and Its Effect on *In Vitro* Human Skin Penetration. **Nanomaterials**, v. 8, n. 8, p. 622, ago. 2018.

HU, J. M.; HSIUNG, G. D. Evaluation of new antiviral agents: *In vitro* perspectives. **Antiviral Research**, v. 11, p. 217–232, out 1989.

IKAWA, Y. et al. Improvement of refractory acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 infection by continuous acyclovir administration. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 25, n. 1, p. 65–67, jan 2019.

LUIS, A. I. S. et al. Zein Nanoparticles Impregnated with Eugenol and Garlic Essential Oils for Treating Fish Pathogens. **ACS Omega**, v. 5, n. 25, p. 15557–15566, jun. 2020.

MELÉNDEZ-VILLANUEVA, M. A. et al. Virucidal activity of gold nanoparticles synthesized by green chemistry using garlic extract. **Viruses**, v. 11, n. 12, nov. 2019.

MITCHELL, M. J. et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. **Nature** v. 1435, n.30, p. 36–43,dez. 2020.

PRITCHETT, J. C.; NAESENS, L.; MONTOYA, J. Treating HHV-6 Infections: The Laboratory Efficacy and Clinical Use of Anti-HHV-6 Agents. The Laboratory Efficacy and Clinical Use of Anti-HHV-6 Agents. In: **Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B, and HHV-7**, v. 452, n. 10, p. 311–331, jul 2014

RAMADAN, M. A. et al. Promising antimicrobial activities of oil and silver nanoparticles obtained from *Melaleuca alternifolia* leaves against selected skin-infecting pathogens. **Journal of Herbal Medicine**, v. 20, p. 100289, abr. 2020.

SALEH, D.; SHARMA, S. Herpes, Simplex, Type 1. **StatPearls Publishing**, v 18, n. 1, p. 9–17, mar 2018.

SILVA, I. T. et al. *In vitro* antiherpes effects of a C-glycosyl flavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. **Letters in applied microbiology**, v. 51, n. 2, p. 143–8, ago. 2010.

SCHNITZLER, P.; REICHLING, J. Wirksamkeit von Pflanzenprodukten gegen Herpesinfektionen. **HNO**, v. 59, n. 12, p. 1176–1184, dez. 2011.

SOUZA, L. G. et al. Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 189–196, set. 2011.

SURH, J.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Utilisation of spontaneous emulsification to fabricate lutein-loaded nanoemulsion-based delivery systems: factors influencing particle size and colour. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 1408–1416, jan 2017.

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, mar 2006.

WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **Lancet**, v 18, n. 1, p. 9–17, maio 2001.

YADAV, E. et al. Tea tree oil: a promising essential oil. **Journal of Essential Oil Research**, n 15, n. 5, p. 300-330, maio 2017

1 DISCUSSÃO GERAL

Óleos voláteis são líquidos extraídos de plantas. Como todos os produtos naturais, estes óleos são misturas complexas, geralmente caracterizadas por um odor forte, que via de regra apresentam mais de 100 substâncias em sua composição (ORTEGA G.G. et al., 2016). Especificamente no campo farmacêutico, os óleos voláteis vêm atraindo considerável atenção devido às suas diversas atividades biológicas relevantes (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Entre os óleos voláteis relevantes, destaca-se o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, extraído das folhas de *Melaleuca alternifolia*, cujo potencial terapêutico vem sendo demonstrado por meio de diversos estudos. O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* contém aproximadamente 100 componentes, dos quais terpinen-4-ol, 1,8 cineol, α -terpineol, terpinoleno α - e γ -terpineno compreendem cerca de 90 % da constituição do óleo (BROPHY et al., 1989b). A composição do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* é regulada por padrão internacional (ISO 4730:2017) no que se refere às máximas e mínimas concentrações de cada um dos 15 componentes majoritários. Comercialmente, os níveis de dois destes compostos são estipulados, sendo de no mínimo 30% para terpinen-4-ol e no máximo 15 % para 1,8-cineol. Ao composto 1,8-cineol são atribuídas propriedades irritantes para a pele, conseqüentemente deve estar presente em baixas concentrações (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006a; RAMACCIATO, 2000).

Estudos pré-clínicos do óleo demonstraram que este possui um amplo espectro de atividades biológicas, dentre as quais destacam-se as atividades antibacteriana (DRYDEN; DAILLY; CROUCH, 2004a), antiviral (BRUN et al., 2018), antifúngica (HAMMER; CARSON; RILEY, 2003b) e anti-inflamatória (WONG; AL-SALAMI; DASS, 2018).

Uma revisão sobre o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, incluindo aspectos como composição química, atividades biológicas, segurança, sistemas de liberação propostos na literatura para sua administração tópica e potenciais aplicações farmacológicas, foi publicada por Yadav e colaboradores (2017), evidenciando o potencial terapêutico deste óleo essencial.

A efetividade das terapias utilizando substâncias ativas não depende somente da comprovação de que determinada substância apresenta atividade em testes farmacológicos. Alguns aspectos biofarmacêuticos, como concentração insuficiente devido à má absorção, metabolismo e eliminação rápidos, distribuição para outros tecidos, combinados com elevada toxicidade e baixa solubilidade condicionam a obtenção de um tratamento eficiente. Com isso, novos sistemas carreadores de fármacos vêm sendo desenvolvidos para contornar esses problemas. Para tanto, são requeridas algumas características a esses sistemas, como adequada

associação com a substância ativa, inexistência de toxicidade, controle de liberação a alvos específicos, estabilidade durante o tempo de armazenagem e possibilidade de escalonamento (MEHNERT; MADER, 2001).

Os sistemas carreadores coloidais têm atraído a atenção nos últimos anos, pois constituem uma estratégia interessante para a melhoria do perfil biofarmacêutico de substâncias terapeuticamente ativas. Apresentam a vantagem de reduzir o número de doses diárias do medicamento, diminuir a toxicidade, solubilizar ativos lipofílicos e hidrofílicos, promover a manutenção da concentração plasmática em níveis terapêuticos e liberar o fármaco no alvo de ação, além de favorecer a adesão do paciente ao tratamento entre outras vantagens (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000).

Nanopartículas, sistemas coloidais com tamanho entre 10 e 1000 nanômetros, podem ser classificadas de acordo com a sua organização estrutural em *nanoesferas*, sistemas matriciais nos quais o fármaco encontra-se disperso ou adsorvido em uma matriz polimérica ou lipídica, e *nanocápsulas*, sistemas reservatórios constituídos por um núcleo recoberto por uma membrana ou revestimento (DES RIEUX et al., 2006). Podem, ainda, ser constituídas por um sistema emulsionado no qual gotículas oleosas de tamanho nanométrico estão dispersas em uma fase contínua externa, estabilizados por um sistema tensoativo adequado, sendo, neste caso, denominados *nanoemulsões* (FRONZA; CAMPOS; TEIXEIRA, 2004).

Diversos trabalhos na literatura têm demonstrado as vantagens da associação de sistemas nanoestruturados ao óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, como descrito no Capítulo 1 deste trabalho. Entre estes sistemas, nanoemulsões (NE) e nanocápsulas (NC) representam sistemas de transporte adequados para a encapsulação de óleos voláteis. Como vantagens, estes sistemas conferem maior estabilidade física, aumento da concentração do ativo no sítio de ação, além de sobrepor as desvantagens potenciais dos óleos voláteis como, por exemplo, a elevada volatilidade e odor pronunciado (BATTISTI; CAON; CAMPOS, 2020).

Nanoemulsões são sistemas heterogêneos e cineticamente estáveis, com tamanho da gotícula normalmente variando de 100 a 500 nm. Estes sistemas podem ser classificados como óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), dependendo da natureza das fases interna e externa (TADROS et al., 2004).

Nanocápsulas consistem em um núcleo oleoso ou aquoso cercado por uma parede polimérica, o que permite aumentar a estabilidade física do sistema. Diversos polímeros são utilizados na preparação das nanocápsulas, entre estes destacam-se o poli ácido láctico (PLA), o poli ácido láctico-co-glicólico (PLGA), a poli-ε-caprolactona (PCL), os copolímeros do ácido

metacrílico e dos ésteres acrilatos, além de diferentes polissacarídeos, tais como celulose e seus derivados, os alginatos e as quitosanas (IQBAL et al., 2011; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010)

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel e obter um produto intermediário estável com potencial para ser utilizado no desenvolvimento de um medicamento fitoterápico antimicrobiano com enfoque no tratamento da sepse e herpes labial.

Sendo assim, este trabalho foi planejado em etapas, envolvendo inicialmente o desenvolvimento de um método de quantificação por cromatografia gasosa para quantificação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e, na sequência, o desenvolvimento e a caracterização físico-química de nanocápsulas e nanoemulsões contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, bem como um estudo de estabilidade dos sistemas desenvolvidos. Como atividade biológica, os sistemas desenvolvidos foram avaliados *in vivo* frente a sepse e *in vitro* como anti-herpéticos.

Para melhor compreensão, este trabalho foi dividido em três capítulos: (1) revisão de literatura com um levantamento dos trabalhos que associaram o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* a sistemas micro e nanoestruturados, (2) desenvolvimento e caracterização dos nanossistemas contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e avaliação *in vivo* da sua atividade frente a sepse e (3) avaliação *in vitro* da atividade anti-herpética das nanocápsulas e nanoemulsões desenvolvidas.

Embora o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* apresente uma conhecida atividade antimicrobiana, a baixa solubilidade, a alta volatilidade e a oxidação do óleo podem limitar a etapa de desenvolvimento da formulação. Nano e micropartículas foram propostas em muitos estudos recentes para superar essas limitações, as vantagens de cada um desses sistemas foram apresentadas neste trabalho em forma de revisão. Além de melhorar as propriedades biofarmacêuticas, esses sistemas de liberação têm se mostrado promissores no aumento da ação antimicrobiana, provavelmente devido à maior interação/ penetração em microrganismos e ação contra bactérias resistentes encontradas em biofilmes, incentivando novas investigações nesta área.

Existe uma conexão estreita entre os constituintes de uma formulação e suas propriedades físico-químicas e biológicas, portanto, a escolha de cada componente representa um passo muito importante e deve ser realizada com precisão.

Dentre esses constituintes, os surfactantes são de extrema importância, pois são responsáveis pela estabilização dos sistemas nanoestruturados. Os surfactantes permitem a manutenção do estado físico de uma dispersão de duas ou mais fases imiscíveis, evitando a separação de fases, portanto, tornando a emulsão estável (IQBAL et al., 2011). A escolha do surfactante, assim como a definição de sua concentração, são de extrema importância, pois uma concentração inadequada não fornecerá cobertura completa da superfície da molécula da substância ativa, o que é necessário para fornecer uma repulsão estérica entre as nanopartículas em suspensão (WANG et al., 2013). Entre os surfactantes mais utilizados na preparação de sistemas nanoestruturados encontra-se o poloxamer 188, um copolímero em bloco de polioxietileno-polioxipropileno, aprovado pelo FDA sob o nome comercial Pluronic® F68 (BASF Wyandotte Corp., Jamesburg, Nova Jersey). Este tensoativo não iônico, com peso molecular de 7680–9510 Da e um valor de balanço hidrófilo-lipofílico (HLB) de 29, é considerado um material não-tóxico (DL50 em camundongos 1 e 15 g/Kg para via parenteral e oral, respectivamente) e não-irritante, sendo amplamente utilizado em formas farmacêuticas de uso oral, parenteral e tópico. São ainda relatadas para este excipiente capacidade mucoadesiva, boas características de liberação do fármaco e compatibilidade com outros produtos químicos (KABANOV; BATRAKOVA; MILLER, 2003).

Neste estudo foram avaliados os tensoativos polissorbato 80 (Tween 80) e poloxamer 188 (Pluronic F68) nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 %, adicionados à fase aquosa durante a preparação das formulações. Nanoemulsões monodispersas (PDI 0,171) e de menor tamanho (131-222 nm) foram obtidas na presença de Pluronic F68, sendo este tensoativo selecionado para dar continuidade ao estudo.

A próxima etapa do trabalho consistiu em definir o polímero a ser utilizado na composição das nanocápsulas. Os polímeros são considerados materiais versáteis na área farmacêutica, sendo muito utilizados na produção de sistemas micro e nanoestruturados. Dentre as propriedades consideradas essenciais relacionadas aos polímeros usados em aplicações farmacêuticas destacam-se a biodegradabilidade, que corresponde à capacidade de degradar-se em ambiente biológico gerando compostos atóxicos que são metabolizados ou excretados, e biocompatibilidade, o que significa não causar efeito adverso local ou sistêmico após sua administração (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008b). Na escolha do polímero deve-se considerar o perfil de liberação desejado, as características do fármaco, além da via de administração (LI; ROUAUD; PONCELET, 2008b; WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008).

Neste trabalho foram avaliados os polímeros poli- ϵ -caprolactona e Eudragit® RS100, ambos amplamente utilizados para a preparação de sistemas de liberação de fármacos. As nanocápsulas preparadas utilizando o polímero Eudragit® RS100 apresentaram menor tamanho (191 nm), distribuição de tamanho de partícula mais homogênea (PDI 0,181) e potencial zeta mais elevado (+33 mV).

Eudragit® RS100 pertence a uma família de copolímeros biocompatíveis, sendo encontrado na forma de grânulos com um ligeiro odor de amina. Este polímero é considerado um polímero não tóxico e não irritante pelo FDA (JÚLIA et al., 2017). Possui grupos químicos que fornecem uma superfície positiva, através da qual ele pode interagir com moléculas carregadas negativamente ou com a superfície de células do tecido alvo (DILLEN et al., 2006).

Um dos parâmetros importantes na caracterização de sistemas nanoestruturados é a determinação da quantidade de total de substância ativa e o percentual efetivamente associada às partículas/gotículas. No caso de encapsulação de substâncias complexas como é o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, uma substância ou grupo de substâncias é escolhida para servir como referência das nanoemulsões e nanocápsulas preparadas neste trabalho, o marcador químico selecionado foi o γ -terpineno.

Um método de cromatografia gasosa com injeção por *headspace* acoplado a espectrômetro de massa foi desenvolvido visando a determinação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* nas nanocápsulas e nanoemulsões. O *headspace* é uma técnica, para determinar compostos voláteis em amostras sólidas e líquidas. Nesta técnica, o analito é, necessariamente, mais volátil que a matriz, e volatiliza preferencialmente, podendo ser determinado sem os interferentes dos outros componentes da amostra, por meio da análise do vapor desprendido do analito. A técnica apresenta como vantagens a fácil preparação da amostra, respeito ao meio ambiente e facilidade de implementação e automação, tornando-se a técnica de preparação de escolha para a análise de compostos voláteis em uma ampla gama de concentrações e tipos de amostra. Por estes motivos, esta técnica foi escolhida para este trabalho. O método desenvolvido mostrou ser específico, linear, preciso e sensível para a quantificação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* a partir dos nanossistemas.

A avaliação da estabilidade frente aos principais fatores que potencialmente possam comprometer a qualidade do produto final em função do tempo é uma etapa fundamental durante o processo de desenvolvimento de uma formulação farmacêutica. A organização mundial da saúde (OMS) define estabilidade farmacêutica como a capacidade de o produto farmacêutico manter as suas propriedades químicas, físicas, microbiológicas e biofarmacêuticas

dentro dos limites especificados durante todo o seu prazo de validade (SANTOS, 2015). A estabilidade dos produtos farmacêuticos depende de vários fatores, que vão desde a composição da formulação, as características físico-químicas de cada componente, além de fatores extrínsecos relacionados às condições do ambiente (temperatura, luz e umidade) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Os fatores que podem influenciar a estabilidade das suspensões coloidais como nanocápsulas e nanopartículas estão relacionados, por exemplo, com a adsorção de moléculas ativas a superfície das nanopartículas, presença de tensoativos adsorvidos, agregação de partículas, instabilidade química do polímero, das substâncias ativas ou de outras matérias-primas e, ainda, a liberação prematura da substância ativa (SCHAFFAZICK et al., 2003a). No caso de nanoemulsões, compostas basicamente de uma fase oleosa e uma fase aquosa, a estabilidade depende principalmente da interação interfacial entre as suas duas fases imiscíveis. Assim, garantir a estabilidade representa um fator importante no desenvolvimento de sistemas nanoparticulados. Duas modalidades de estudo de estabilidade (acelerada e em tempo real) foram conduzidas com o objetivo de avaliar a capacidade dos sistemas em manter as principais características das formulações (tamanho médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH). No estudo em tempo real, as foram avaliadas diferentes temperaturas (4 e 25 °C) e exposição à luz durante 60 dias, e foram utilizados como controles nanopartículas brancas (formulação semelhante às nanocápsulas sem a presença do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e o óleo puro. As formulações contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (NE-TTO e NC-TTO) não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros avaliados durante todo o tempo de estudo frente a temperatura, indicando a ausência de influência da temperatura sobre as principais características físico-químicas das formulações desenvolvidas. Diferente da temperatura, a exposição à luz acarretou alterações em NE-TTO, sendo observadas diferenças significativas no diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão, potencial zeta e pH a partir do quinto dia. As nanocápsulas não apresentaram alterações nos valores de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta, provavelmente devido a presença do polímero, porém observou-se uma diminuição do pH. Na análise de estabilidade acelerada foi possível monitorar as variações de transmitância ao longo da amostra inserida na cubeta e submetida à centrifugação em centrífuga analítica. Quanto maior for o deslocamento da linha vermelha com a linha verde (perfis de transmissão), menor será a estabilidade da emulsão. De forma geral as formulações não apresentaram mudança significativa da transmitância. Com base nos resultados deste estudo, nas etapas subsequentes as formulações foram armazenadas em frasco âmbar a fim de proteger da exposição à luz.

Na sequência, foi avaliada a atividade das NC-TTO e NE-TTO frente à sepse. A sepse é uma síndrome complexa decorrente de uma infecção que pode ser ocasionada por diferentes micro-organismos como fungos, vírus e principalmente por bactérias. Dois estudos realizados em unidades de terapia intensiva (UTIs) do Brasil constataram que bacilos Gram-negativos representavam os agentes mais frequentemente identificados, seguidos por Gram-positivos e vírus. As infecções mais comumente associadas à ocorrência da sepse são a pneumonia, infecção intra-abdominal e a infecção urinária (SALES JÚNIOR et al., 2006; SILVA et al., 2012).

A sepse é caracterizada pela presença de um foco infeccioso, por alterações hemodinâmicas e pela resposta inflamatória, que pode levar à disfunção ou falência de um ou mais órgãos ou até mesmo à morte. Os sinais clínicos incluem: febre, confusão mental, hipotensão transitória, oligúria e trombocitopenia (CARVALHO; TROTTA, 2003; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011). Esta é uma das patologias mais desafiadoras da medicina e tornou-se um problema de saúde pública devido ao crescente número de casos, alta mortalidade e custo elevado de tratamento.

Machado e colaboradores (2019) estudaram a incidência global de sepse grave. Houve uma estimativa de 11,0 milhões de mortes relacionadas à sepse em todo o mundo em 2017, representando 19,7 % das mortes naquele ano.

No Brasil, estimativas apontam a existência de aproximadamente 600 mil novos casos de sepse a cada ano e suas consequências são responsáveis pelas causas de 16,5 % de atestados de óbitos emitidos no país (RIBEIRO; MACHADO, 2016).

Cabe salientar que, além dos custos sociais e de vidas perdidas, há um enorme ônus financeiro associado a sepse. Nos EUA, o custo estimado de tratamento por paciente é de aproximadamente 38 mil dólares, enquanto que no Brasil estima-se um valor de 9,6 mil dólares (RIBEIRO; MACHADO, 2016). Durante muitos anos, a pluralidade de definições para caracterizar a sepse constituiu uma importante limitação para o seu melhor conhecimento. As nomenclaturas anteriores causavam confusão tanto do ponto de vista clínico quanto da pesquisa, indicando a necessidade de definições padronizadas para melhor identificação da doença. Em 1991 foi realizada uma conferência na qual delimitações conceituais com base no quadro evolutivo da doença foram propostas. O encontro entre a American College of Chest Physicians e a Society of Critical Care Medicine gerou uma série de definições, que continuam sendo usadas até hoje (QUADRO 1) (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011).

Quadro 1 Definições de síndrome de resposta inflamatória sistêmica, sepse, sepse grave, choque séptico e disfunção de múltiplos órgãos e sistemas.

Termo	Conceito
Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS):	Presença de pelo menos 2 dos seguintes sinais: a) temperatura central > 38,3° C ou < 36°C; b) frequência cardíaca > 90bpm; c) frequência respiratória > 20 rpm ou PaCO ₂ < 32 mmHg ou necessidade de ventilação mecânica; d) leucócitos totais > 12.000/mm ³ ou < 4.000/mm ³ ou presença de > 10 % de formas jovens.
Sepse	SIRS desencadeada por infecção bacteriana, viral, fúngica ou parasitária.
Sepse grave	Quadro de sepse associado à disfunção orgânica (as principais disfunções orgânicas são: cardiovascular, respiratória, renal, hematológica e do sistema nervoso central), hipoperfusão tecidual e hipotensão responsiva à hidratação vigorosa.
Choque séptico	Situação em que o paciente com quadro de sepse grave desenvolve hipotensão arterial e alteração perfusional, refratárias à reposição volêmica. A hipotensão persiste mesmo com a utilização de agentes vasopressores.
Disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (DMOS)	Presença de função anormal de três ou mais órgãos em pacientes críticos, no qual a homeostasia não pode ser mantida sem intervenção médica.

A sepse é uma infecção desencadeada por micro-organismos infectantes que são capazes de interagir com o sistema imune do hospedeiro e produzir uma resposta inflamatória

que leva à liberação de inúmeros mediadores desencadeando uma resposta sistêmica. A interação entre agente agressor e hospedeiro depende de características tanto de um quanto de outro, dando início a um processo complexo, acarretando na ativação quase simultânea da resposta imune inata e adquirida (COHEN, 2002; GEZSKE-MORITZ; MORITZ, 2016; TUPCHONG; KOYFMAN; FORAN, 2015).

A resposta imune inata é determinante na defesa do hospedeiro nas fases iniciais da infecção. A partir do momento da invasão pelos micro-organismos ocorre reconhecimento por receptores de estruturas existente na parede dos patógenos, sinalizando-os como constituintes não próprios do hospedeiro. Esses receptores são denominados Toll-like e apresentam-se preferencialmente em monócitos e macrófagos (KAISHO; AKIRA, 2002).

Os principais componentes da parede celular de micro-organismos identificados por receptores Toll-like (TLR) são: lipopolissacarídeos (LPS), peptídeo glicano, ácido lipoproteico, lipoproteínas e DNA citosina-fosfato-guanosina bacteriana. Esses componentes são essenciais para a sobrevivência e patogenicidade dos micro-organismos e são denominados como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) (CIANCIARULLO et al., 2014; KAISHO; AKIRA, 2002). Quando os PAMPs são reconhecidos pelos TLR, ocorre todo o desencadeamento da resposta imune do hospedeiro através da indução de citocinas pró-inflamatórias e a regulação de moléculas de expressão co-estimuladoras (BRIGHTBILL; MODLIN, 2000). A liberação de citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-1 β (IL-1 β), desencadeia uma intensa resposta celular, com liberação de mediadores secundários como outras citocinas, fatores do complemento, prostanoídes, fator de agregação plaquetária, espécies reativas de oxigênio, quimiotaxia e ativação de granulócitos (ABEID; SOUZA; BASILE-FILHO, 1998; BONE, 1991).

Os mediadores envolvidos na geração de resposta inflamatória ocasionam três fenômenos fundamentais: (i) lesão do endotélio capilar com extravasamento de líquidos; (ii) vasodilatação com queda da resistência vascular sistêmica (RVS) e microtrombozes por ativação da coagulação e (iii) fenômenos de adesão de leucócitos ao endotélio (IWASE et al., 2013).

Previamente à realização dos ensaios com sepse, foi necessária a avaliação da citotoxicidade dos sistemas, para assegurar a segurança dos mesmos. Ensaios de citotoxicidade do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* livre, NE-TTO, NC-TTO e nanopartículas brancas foram realizados pelo ensaio colorimétrico *in vitro* Sulforrodamina B. Para a realização dos testes, duas linhagens celulares foram escolhidas: (i) RAW 264,7, uma linhagem macrofágica

aderente e imortalizada por vírus, que preserva todas as características de uma célula fagocitária do sistema mononuclear (RASCHKE et al., 1978), e (ii) HEK 293, derivada da transformação de culturas primárias de rim embrionário humano com DNA de adenovírus fragmentado (LISTE-CALLEJA; LECINA; CAIRÓ, 2014).

As nanopartículas brancas (NB) apresentaram valores de $CI_{50} > 1500 \mu\text{g/mL}$ para ambas as linhagens. Assim, pode-se afirmar que NB, nas condições testadas, não apresentaram efeitos citotóxicos, ou seja, os demais componentes presentes nas formulações são seguros para as células. Para NE-TTO e NC TTO verificou-se a diminuição da viabilidade celular, da mesma forma para o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* livre, o que corrobora com outros trabalhos encontrados na literatura. Soderberg e colaboradores (1996) avaliaram o efeito citotóxico de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em células epiteliais e fibroblastos humanos. Eles observaram que concentrações acima de $300 \mu\text{g/mL}$ causavam um declínio na viabilidade celular. Devido ao caráter lipofílico, o óleo interage com as membranas celulares, perturbando assim a atividade normal da membrana.

Estudos de sepse em humanos são difíceis de realizar devido à severidade da doença e heterogeneidade dos pacientes. Desta forma, modelos animais constituem boa alternativa de estudo, pois são capazes de reproduzir a vasodilatação, hipotensão, aumento do débito cardíaco, resposta ao tratamento e mortalidade vistos em pacientes sépticos. Um modelo de experimentação animal de qualidade deve ser reprodutível, ser mínimo em variáveis e proporcionar um grande nível de detalhamento sobre um organismo. Diversos modelos experimentais são utilizados para o estudo da sepse, entre eles: modelo de sepse abdominal, sepse cutânea, sepse induzida pela administração de lipopolissacarídeos (LPS) ou fator de necrose tumoral, entretanto os modelos que induzem peritonite são mais amplamente utilizados (FINK, 2014).

O modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP) vem sendo considerado como padrão ouro para estudo da sepse por produzir uma infecção polibacteriana em um foco localizado e ter uma grande similaridade com a progressão da sepse em humanos (DEJAGER et al., 2011). Em resumo, este modelo se baseia na ligação do ceco logo abaixo da válvula ileocecal. A ligadura cecal é seguida pela punção do ceco por uma agulha de tamanho definido e posterior liberação de conteúdo fecal para a cavidade peritoneal. Este processo é a fonte crônica de estímulos inflamatórios na progressão da doença (RITTER, 2003).

Sepse intra-abdominal foi induzida em camundongos Swiss usando a técnica de CLP, conforme descrito acima. Vinte quatro horas após o procedimento cirúrgico, os animais foram

eutanasiados sob anestesia. Rim, pulmão e lavado peritoneal foram isolados para a realização da quantificação de parâmetros bioquímicos (infiltração de neutrófilos, oxidação de grupamentos sulfidrila e atividade antibacteriana).

Já está descrito na literatura a participação do estresse oxidativo na patogênese da sepse (PRAUCHNER; PRESTES; DA ROCHA, 2011). Após algum evento prejudicial ao tecido, como por exemplo um trauma ou infecção, os macrófagos e monócitos secretam citocinas, como IL-1 e TNF α que, por sua vez, ativam células inflamatórias, como neutrófilos, plaquetas e mastócitos. Grandes quantidades de oxidantes tóxicos são liberadas, causando lesão celular através de vários mecanismos, incluindo dano oxidativo de proteínas (ŞENER et al., 2005).

Vários métodos têm sido utilizados para definir o papel dos neutrófilos na lesão tecidual. Um deles é a quantificação da enzima específica de neutrófilos, a mieloperoxidase (LAIGHT et al., 1994; ŞENER et al., 2005). Os nossos resultados mostraram uma diminuição significativa na atividade de MPO no lavado peritoneal (NE-TTO e NC-TTO) e no rim (NE-TTO), quando comparados ao grupo controle (solução salina) (Figura 7). Esses resultados sugerem que as lesões oxidativas induzidas pela sepse nestes tecidos são dependentes de neutrófilos e são reversíveis pelo tratamento com NE-TTO e NC-TTO. Em contrapartida, no pulmão os resultados não mostraram uma diminuição significativa da atividade de MPO.

Os compostos tiólicos são antioxidantes que apresentam em sua estrutura o grupamento sulfidrila, os quais são capazes de captar os radicais livres, especialmente quelando íons metálicos (WLODEK, 2010). Os resultados obtidos indicaram que o conteúdo tiólico total aumentou nos rins e pulmão tanto nos animais tratados com NC-TTO como nos animais tratados com NE-TTO, o que representa um aumento da defesa não enzimática antioxidante nos animais.

Os resultados do estudo de atividade antibacteriana mostraram a diminuição significativa no crescimento bacteriano no lavado peritoneal dos grupos tratados (NE-TTO e NC-TTO) quando comparado ao grupo controle (solução salina). Este pode ser considerado um resultado bastante interessante, uma vez que, devido à sua composição complexa, óleos voláteis oferecem um baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana.

O conjunto dos resultados obtidos neste estudo sugere que ambos os sistemas nanoestruturados desenvolvidos (NE-TTO e NC-TTO) são promissores para o tratamento da sepse, pois diminuíram a inflamação dos tecidos, aumentaram a proteção contra os danos às proteínas e diminuíram o crescimento bacteriano no local da infecção. Até o momento, esse

trabalho foi o primeiro a avaliar sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* na sepse induzida pelo modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP).

No Capítulo 3 são apresentados os resultados da atividade anti-herpética dos sistemas. A infecção pelo vírus Herpes Simplex Tipo 1 (HSV-1) ocorre em todo o mundo e representa uma das infecções mais difundidas da região orofacial (ARDUINO; PORTER, 2007). Nos EUA, estima-se que haja 500.000 novas infecções primárias por ano. As infecções primárias são adquiridas pelo contato direto com uma lesão ou com saliva, fluidos genitais e exsudatos de lesões ativas. Após a infecção inicial, o vírus permanece latente nos neurônios. As infecções recorrentes ocorrem em intervalos variáveis, variando de meses a anos. Os vírus são parasitas intracelulares e sua replicação depende do maquinário biossintético da célula hospedeira, dificultando o desenvolvimento de antivirais seguros e eficazes sem prejudicar o hospedeiro ao mesmo tempo (ARDUINO; PORTER, 2008; EPSTEIN, 2009).

O *Herpes Simplex Virus- Tipo 1* (HSV-1) é uma infecção altamente contagiosa, comum e endêmica em todo o mundo, não têm variação sazonal e, naturalmente, infecta apenas seres humanos. A infecção por HSV-1 raramente é fatal. Este vírus é geralmente transmitido através do contato com lesões herpéticas, superfícies mucosas e secreções orais. e pode evoluir para patologias mais graves, como encefalite, ceratite ou gengivoestomatite. Além disso, embora o HSV-1 seja causado principalmente por contato oral-oral, ele tem o potencial de ser transmitido por meio do sexo oral, causando uma infecção genital (COLE, 2020; EL-TOUMY et al., 2018; IKAWA et al., 2019).

O HSV-1 é classificado, de acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), como pertencente à ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *α -Herpesvirinae* e gênero *Simplex Virus* (ICTV, 2014). O vírion ou partícula infecciosa apresenta um núcleo contendo DNA de fita dupla, envolvido pelo capsídeo icosaédrico. Em seu contorno há uma camada preenchida com proteínas, denominada tegumento, que por sua vez é envolto por um envelope lipídico com espículas glicoproteicas em sua superfície (WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

A exposição inicial ao HSV-1 leva à invasão viral das células epiteliais e à replicação intracelular no local da exposição primária. Após a infecção primária, o vírus se replica no local da infecção e passa a viajar pelas fibras sensoriais amielínicas até o gânglio trigêmeo, onde estabelece a latência. Os gânglios tornam-se reservatórios para surtos futuros. O período de incubação pode variar de 1 a 26 dias, causando destruição celular e inflamação local resultando em lesões vesiculares eritematosas, que apresentam regressão espontânea. O período de

transmissão varia de 4 a 12 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas. Alguns estímulos podem desencadear a reativação do vírus: estresse psicológico ou fisiológico, radiação UVB, trauma, menstruação, sideropenia ou doença febril. A infecção por HSV-1 dura toda a vida (SALEH; SHARMA, 2018).

Óleos voláteis são promissores como fontes para o desenvolvimento de novos agentes antivirais, uma vez que sintetizam um grande número de compostos químicos com estruturas complexas e, com isso, são uma alternativa para a resistência aos antivirais sintéticos (SCHNITZLER, 2019). Os óleos voláteis exibem propriedades antivirais contra vírus com envelope. Cerca de metade de todos os vírus possuem um envelope, que consiste em uma bicamada lipídica que contém proteínas virais para fixação de células e circunda o capsídeo viral. Todos os herpes vírus possuem envelope (ASTANI; REICHLING; SCHNITZLER, 2011).

A aplicação tópica é a melhor maneira de tratar o herpes labial. Na medicina popular para o tratamento das infecções herpéticas, os óleos voláteis são usados em formas diluídas para aplicação sobre as lesões. Porém, de maneira geral, óleos voláteis apresentam um potencial significativo de irritação da pele e mucosas (SCHNITZLER; REICHLING, 2011).

Na investigação da potencial atividade anti-herpética dos sistemas desenvolvidos, inicialmente foi averiguada a citotoxicidade do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* livre, NC-TTO e NE-TTO e NB em células Vero, pelo ensaio colorimétrico *in vitro* de Sulforrodamina B (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). A incorporação de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* nos nanossistemas diminuiu a citotoxicidade nestas células, com destaque para NC-TTO, que apresentou menor toxicidade (CC_{50} 630,5 $\mu\text{g/mL}$) comparado a NE-TTO (CC_{50} 221,4 $\mu\text{g/mL}$) e ao óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* livre (CC_{50} 179,8 $\mu\text{g/mL}$).

A avaliação da atividade anti-herpética dos sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e do óleo livre foi realizada pelo ensaio de redução do número de placas. NE-TTO e NC-TTO apresentaram índice de seletividade (IS) de 57,47 e 30,9, respectivamente e com valor de IC_{50} de 3,48 e 21,28 $\mu\text{g/mL}$. O óleo livre apresentou valores de IS de 10,35 e IC_{50} de 16,99 $\mu\text{g/mL}$. O índice de seletividade de um composto é um parâmetro amplamente aceito usado para expressar a eficácia da inibição *in vitro* de um composto na replicação do vírus (PRITCHETT; NAESENS; MONTOYA, 2014). NE-TTO apresentou um valor de IC_{50} e IS mais baixo que o NC-TTO, indicando que este seria mais seguro para estudos *in vivo* o HSV-1. Nossos resultados demonstraram que o encapsulamento

do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em sistemas nanoestruturados potencializou a atividade antiviral do óleo.

2 REFERÊNCIAS

BATTISTI, M. A.; CAON, T.; CAMPOS, A. M. A Short review on the antimicrobial micro- and nanoparticles loaded with *Melaleuca alternifolia* essential oil. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 8, n. 4, p. 102283, dez. 2020.

BOFF, L. et al. Elucidation of the mechanism of anti-herpes action of two novel semisynthetic cardenolide derivatives. **Archives of Virology**, v. 165, n. 6, p. 1385–1396, jun. 2020.

BONE, R. C. The pathogenesis of sepsis. **Annals of internal medicine**, v. 115, n. 6, p. 457–69, set. 1991.

BRIGHTBILL, H. D.; MODLIN, R. L. Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response. **Immunology**, v. 101, n. 1, p. 1–10, set. 2000.

BRUN, P. et al. *In Vitro* Antimicrobial Activities of Commercially Available Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Essential Oils. **Current Microbiology** v. 1, n. 2 p. 3, nov 2018.

BROPHY, J. J. et al. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 5, p. 1330–1335, set. 1989.

CARSON, C. F. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil gel (6 %) for the treatment of recurrent herpes labialis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 450–451, set. 2001.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: A review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v 43, n. 2, p. 565–477, jan. 2006.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885–891, dez. 2002.

COLE, S. Herpes Simplex Virus: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Clinics of North America** v 10, n. 15, p. 112-120, set. 2020.

DEJAGER, L. et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in microbiology**, v. 19, n. 4, p. 198–208, abr. 2011.

DES RIEUX, A. et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. **Journal of Controlled Release**, v. 116, n. 1, p. 1–27, nov. 2006.

DILLEN, K. et al. Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit® RS100 or

RL100/PLGA nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 314, n. 1, p. 72–82, maio 2006.

DONALISIO, M. et al. *In vitro* anti-herpes simplex virus activity of crude extract of the roots of *Nauclea latifolia* Smith (rubiaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, out. 2013.

DRYDEN, M. .; DAILLY, S.; CROUCH, M. A randomized, controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization. **Journal of Hospital Infection**, v. 56, n. 4, p. 283–286, abr. 2004.

EL-TOUMY, S. A. et al. Antiviral effect of polyphenol rich plant extracts on herpes simplex virus type 1. **Food Science and Human Wellness**, v. 7, n. 1, p. 91–101, mar. 2018.

FALCI, S. P. P. et al. Antimicrobial activity of *Melaleuca* sp. oil against clinical isolates of antibiotics resistant *Staphylococcus aureus*. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 401–406, jun. 2015.

FINK, M. P. Animal models of sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 143–53, jan. 2014.

FRONZA, T.; CAMPOS, A. M.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 558–66, out 2004.

GAROZZO, A. et al. Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on Influenza virus A/PR/8: Study on the mechanism of action. **Antiviral Research**, v. 89, n. 1, p. 83–88, 2011.

GEZSKE-MORITZ, M.; MORITZ, M. Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: Composition, properties and therapeutic strategies. **Material Sciences and Engineering C**, v. 68, p. 982–994, mar 2016.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of applied microbiology**, v. 95, n. 4, p. 853–60, fev 2003.

HART, P. H. et al. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflammation Research**, v. 49, n. 11, p. 619–626, nov. 2000.

IKAWA, Y. et al. Improvement of refractory acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 infection by continuous acyclovir administration. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 25, n. 1, p. 65–67, jan. 2019.

IQBAL, B. et al. Recent advances and patents in solid dispersion technology. **Recent patents on drug delivery & formulation**, v. 5, n. 3, p. 244–64, set. 2011.

IWASE, T. et al. A simple assay for measuring catalase activity: a visual approach.

Scientific reports, v. 3, p. 3081, 30 out. 2013.

KABANOV, A. V.; BATRAKOVA, E. V.; MILLER, D. W. Pluronic® block copolymers as modulators of drug efflux transporter activity in the blood-brain barrier.

Advanced Drug Delivery Reviews, v. 55, n. 1, p. 151–164, 21 jan. 2003.

KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1589, n. 1, p. 1–13, fev. 2002.

LAIGHT, D. W. et al. Assessment of myeloperoxidase activity in renal tissue after ischemia/reperfusion. **European journal of pharmacology**, v. 292, n. 1, p. 81–8, nov. 1994.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, n. 1–2, p. 26–39, nov. 2008.

LISTE-CALLEJA, L.; LECINA, M.; CAIRÓ, J. J. HEK293 cell culture media study towards bioprocess optimization: Animal derived component free and animal derived component containing platforms. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 4, p. 471–477, abr. 2014.

MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 47, n. 2–3, p. 165–196, jun 2001.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 113–142, jan. 2010.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - A review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 185, n. 2, p. 131–140, jul. 2000.

PRAUCHNER, C. A.; PRESTES, A. DE S.; DA ROCHA, J. B. T. Effects of diphenyl diselenide on oxidative stress induced by sepsis in rats. **Pathology - Research and Practice**, v. 207, n. 9, p. 554–558, set. 2011.

PRITCHETT, J. C.; NAESENS, L.; MONTOYA, J. Treating HHV-6 Infections: The Laboratory Efficacy and Clinical Use of Anti-HHV-6 Agents. The Laboratory Efficacy and Clinical Use of Anti-HHV-6 Agents. In: **Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B, and HHV-7**, v. 452, n. 10, p. 311–331, jul 2014

RASCHKE, W. C. et al. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. **Cell**, v. 15, n. 1, p. 261–7, set. 1978.

RITTER, C. et al. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal

ligation and perforation. **Intensive Care Medicine**, v. 29, n. 10, p. 1782–1789, out. 2003.

SALEH, D.; SHARMA, S. Herpes, Simplex, Type 1. **StatPearls Publishing**, v 18, n. 1, p. 9–17, mar 2018.

SCHNITZLER, P. Essential oils for the treatment of Herpes Simplex Virus Infections. **Chemotherapy**, v. 64, n. 1, p. 1–7, jul. 2019.

SCHNITZLER, P.; REICHLING, J. Wirksamkeit von Pflanzenprodukten gegen Herpesinfektionen. **HNO**, v. 59, n. 12, p. 1176–1184, dez. 2011.

SCHNITZLER, P.; SCHÖN, K.; REICHLING, J. Antiviral activity of Australian tea tree oil and Eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. **Pharmazie**, v. 56, n. 4, p. 343–347, abr. 2001.

ŞENER, G. et al. Protective effect of β -glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. **International Immunopharmacology**, v. 5, n. 9, p. 1387–1396, ago. 2005.

SILVA, E. et al. Prevalência e desfechos clínicos de infecções em UTIs brasileiras: subanálise do estudo EPIC II. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 24, n. 2, p. 143–150, jun. 2012.

SÖDERBERG, T. A.; JOHANSSON, A.; GREF, R. Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. **Toxicology**, v. 107, n. 2, p. 99–109, set 1996.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, out 2004.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, dez 2006.

WANG, Y. et al. Stability of nanosuspensions in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 3, p. 1126–1141, dez. 2013.

WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **Lancet**, v 18, n. 1, p. 9–17, maio 2001.

WISCHKE, C.; SCHWENDEMAN, S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 2, p. 298–327, dez. 2008.

WONG, C. Y.; AL-SALAMI, H.; DASS, C. R. Microparticles, microcapsules and microspheres: A review of recent developments and prospects for oral delivery of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 537, n. 1–2, p. 223–244, nov 2018.

YADAV, E. et al. Tea tree oil: a promising essential oil. **Journal of Essential Oil**

Research, n 15, n. 5, p. 300-330, maio 2017

ZHANG, X. et al. *In Vitro* Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil. **BioMed Research International**, v. 28, n 13, p. 1–8, maio 2018.

CONCLUSÕES GERAIS

3 CONCLUSÕES GERAIS

Nanoemulsões contendo Tea tree oil (NE-TTO) foram desenvolvidas pela técnica de emulsificação espontânea. O estudo de formulação mostrou que o tensoativo hidrofílico Pluronic® F68 na concentração de 1,5 % permitiu a obtenção de nanoemulsões com características físico-químicas considerados satisfatórias (tamanho de 131-222 nm, PDI $0,171 \pm 0,1$ e potencial zeta $-38 \pm 0,6$ mV), sendo então utilizado para a preparação dos sistemas nanoestruturados e continuidade dos estudos.

Nanocápsulas contendo Tea tree oil (NC-TTO) foram preparadas pela técnica de nanoprecipitação. Dois polímeros foram avaliados para a formação das partículas, a poli-ε-caprolactona e o Eudragit® RS100. O Eudragit permitiu a formação de partículas de menor tamanho (197 nm) e monodispersas (0,1) e, portanto, foi o polímero de escolha para a preparação destes sistemas.

Uma metodologia analítica por cromatografia gasosa acoplado a detector de massa para quantificação do γ -terpineno, um dos componentes majoritários do óleo volátil de *Melaleuca alternifolia*, foi desenvolvida e validada. O método desenvolvido mostrou-se linear, sensível, específico e preciso para a quantificação do teor de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* presente nas formulações.

Os estudos de estabilidade demonstraram que os sistemas nanoestruturados apresentaram-se estáveis nas duas condições de temperatura (4 °C e 25 °C). Os fatores avaliados (tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta) se mantiveram sem alterações significativas. Entretanto, após exposição à luz, as nanoemulsões permaneceram estáveis durante apenas cinco dias. No estudo de estabilidade acelerada os índices de instabilidade não sofreram alterações significativas.

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* livre e os sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* não mostraram diferença significativa entre si no valor de toxicidade para as células RAW e HEK, nas condições experimentais testadas.

O estudo *in vivo* evidenciou o efeito benéfico dos sistemas nanoestruturados no modelo de sepse estudado. Nossos dados mostraram que o tratamento com NE-TTO e NC-TTO promoveu proteção efetiva do rim, disfunção pulmonar induzida pelo modelo CLP de sepse e com atividade antibacteriana. Além disso, nossos resultados sugerem que a atividade dos sistemas pode ser, pelo menos em parte, atribuída à sua atividade antioxidante por prevenir o aumento da inflamação dos neutrófilos e potencializar o efeito antioxidante. Assim, NE-TTO e NC-TTO são promissores para o tratamento eficaz das disfunções induzidas pela sepse.

O estudo *in vitro* realizado pelo método de redução de número de placa viral evidenciou o aumento da atividade anti-herpética de NE-TTO e NC-TTO em comparação ao óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* livre, indicando que esses sistemas parecem ser promissores para a entrega efetiva do óleo volátil no tratamento de infecções por herpes.

APÊNDICE A

1.1 ESTUDO DE FORMULAÇÃO COMPLEMENTAR

1.1.1 Seleção do co-solvente

A escolha do co-solvente é um ponto crítico na formação dos sistemas nanoestruturados, visto que estes excipientes têm como função auxiliar na diminuição da tensão interfacial, e, com isso, contribuir na obtenção de partículas pequenas (CAVALLI et al., 1996). De acordo com a literatura, compostos alcoólicos e glicólicos com baixo peso molecular são mais eficazes para esta finalidade (MOJAHEDIAN et al., 2013).

Neste trabalho fez-se necessária a utilização de um co-solvente (EtOH ou PPG) para aumentar a solubilidade do tensoativo lipofílico (lecitina de soja) visto que o mesmo, devido a proporção de fosfatidilcolina (75 %), apresentava baixa solubilidade na fase oleosa.

Para a obtenção das nanoemulsões, foram preparadas formulações com dois tipos de co-solventes (EtOH ou PPG). A Tabela 1 apresenta os valores de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta dos sistemas nanoestruturados obtidos. Todas as formulações testadas apresentaram-se macroscopicamente como sistemas coloidais sem a formação de aglomerados. Como pode ser observado na Tabela 1, houve influência do tipo de co-solvente sobre os parâmetros avaliados. O tamanho de partícula variou entre 178 a 271 nm e 122 a 161 nm quando preparadas com PPG e EtOH, respectivamente ($p < 0,05$). O potencial zeta das nanoemulsões apresentaram valores de -27 para PPG e -31 mV para EtOH.

O índice de polidispersão das nanoemulsões produzidas com PPG (NE-PPG) (0,5) foi menor em comparação às nanoemulsões que continham EtOH (NE-EtOH) (1,0) na sua composição ($p < 0,01$). O índice de polidispersão (PDI) é um parâmetro que indica a homogeneidade da distribuição dos tamanhos das partículas e é considerado um parâmetro importante no controle de qualidade de suspensões coloidais. Tamanhos pouco homogêneos interferem na distribuição de partículas *in vivo*. Valores de PDI acima de 0,2 são descritos na literatura como indicativo de uma ampla distribuição de tamanhos e valores abaixo disso representam populações de partículas monodispersas (LIU; WU, 2010). Como pode ser observado a formulação NE-EtOH apresentou ampla distribuição de tamanho (PDI 1,0). Com isso as nanoemulsões preparadas com PPG foram selecionadas para dar continuidade ao trabalho.

Tabela 1 Resultados obtidos no estudo de formulação para seleção do co-solvente para resposta tamanho de partícula índice de polidispersão e potencial zeta na seleção do co-solvente.

Respostas	NE-EtOH	NE-PPG
Tamanho (nm)	145	244
PDI	1,0	0,5
Potencial zeta (mV)	-31	-27

PDI: índice de polidispersão; NE-PPG: nanoemulsões produzidas com propilenoglicol; NE-EtOH: nanoemulsões produzidas com etanol

APÊNDICE B

2.1 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS FRENTE À SEPSE

A sepsé é uma das principais causas de morte entre pacientes graves. Já se tem descrito na literatura a participação do estresse oxidativo na patogênese na doença (PRAUCHNER; PRESTES; ROCHA, 2011). Sabe-se que após algum evento prejudicial ao tecido, como por exemplo um trauma ou infecção, os macrófagos e monócitos secretam citocinas, como IL-1 e TNF α . Essas citocinas ativam células inflamatórias, como neutrófilos, plaquetas e mastócitos liberando grande quantidade de oxidantes tóxicos, que causam lesão celular através de vários mecanismos, incluindo a peroxidação lipídica e dano oxidativo de proteínas e DNA (ŞENER et al., 2005). Os marcadores do estresse oxidativo na sepsé incluem aumento dos níveis de malondialdeído, aumento dos grupos de proteínas carbonilas e aumento da razão superóxido dismutase/catalase causando acúmulo de H₂O₂ nas células (PRAUCHNER, 2017).

O estudo *in vivo* em modelo CLP utilizando camundongos Swiss está descrito no capítulo 2, no artigo intitulado **Development of *Melaleuca alternifolia* essential oil nanoemulsions and nanocapsules for sepsis treatment**, que, no entanto, não descreve a totalidade dos ensaios que foram realizados. Estudos sobre os efeitos de NE-TTO e NC-TTO sobre importantes parâmetros de estresse oxidativo em rim, pulmão, fígado, baço, soro e lavado peritoneal de animais sépticos foram realizados, e são descritos a seguir.

2.1.1 Atividade de mieloperoxidase – MPO

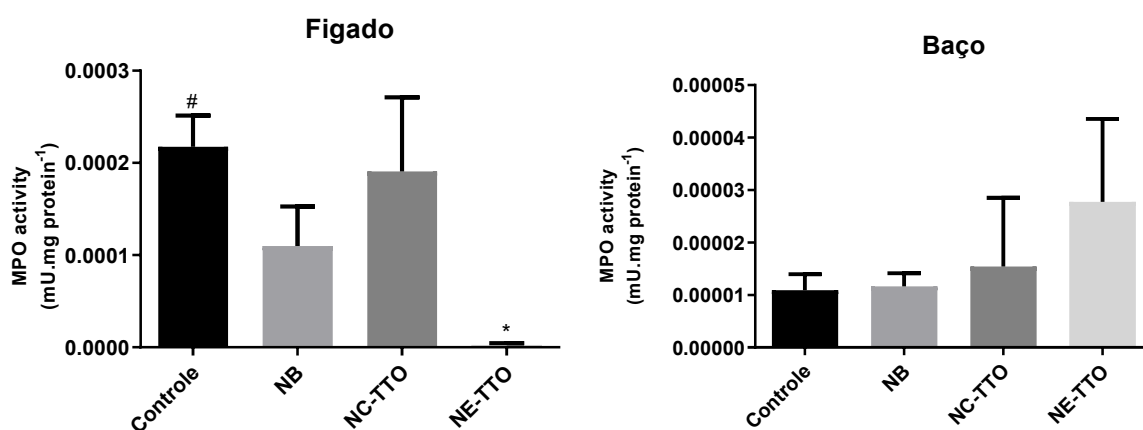
A inflamação nos tecidos foi mensurada através da dosagem dos níveis de MPO no lavado peritoneal (LP), fígado, baço, pulmão e rim dos animais. Em muitas doenças e distúrbios inflamatórios agudos, componentes do processo patológico estão ligados à capacidade dos neutrófilos de liberar uma variedade complexa de agentes que podem destruir células normais.

Vários métodos têm sido utilizados para definir o papel dos neutrófilos na lesão tecidual. Um deles é a quantificação da enzima específica de neutrófilos, a mieloperoxidase (LAIGHT et al., 1994; ŞENER et al., 2005). Os resultados mostraram uma diminuição significativa na atividade de MPO no fígado (NE-TTO), quando comparados ao grupo controle (solução salina) (Figura 1). Esses resultados sugerem que as lesões oxidativas induzidas pela sepsé nestes tecidos são dependentes de neutrófilos e são reversíveis pelo tratamento com NE-TTO e NC-TTO.

Caldefie-Chézet e colaboradores (2004) avaliaram as atividades antioxidante e anti-inflamatória do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. Neste estudo, os autores investigaram

in vitro o possível papel do óleo na modulação de leucócitos (monócitos e neutrófilos polimorronucleares) em sangue de voluntários humanos saudáveis. Os autores demonstraram que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* diminui a produção intracelular de EROs dependentes principalmente de neutrófilos.

Figura 1 Efeitos dos sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* na atividade de mieloperoxidase no fígado e baço do modelo *in vivo* CLP.



Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n=5). Avaliada por Teste t de Student.

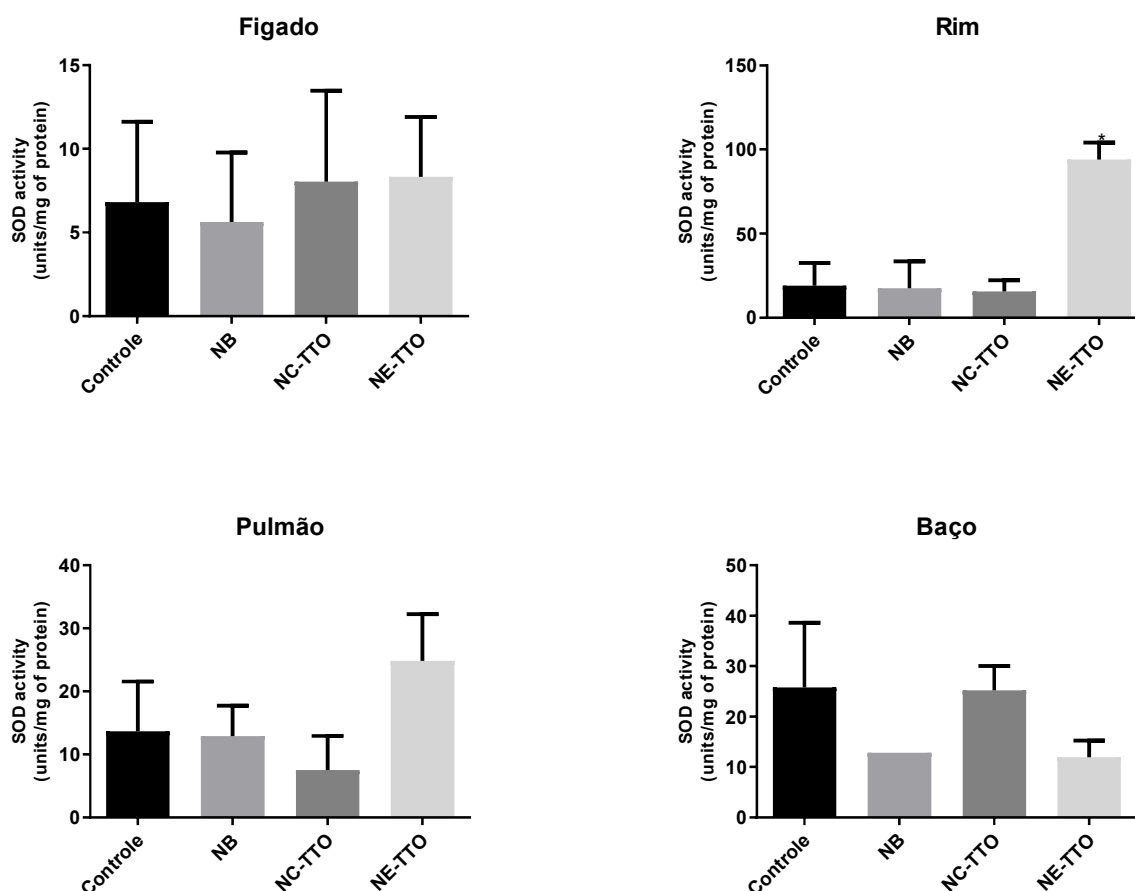
* $p < 0,05$

2.1.2 Determinação do potencial antioxidante

A regulação entre enzimas antioxidantes exerce um papel importante para manter o equilíbrio entre a geração e o consumo de espécies reativas de oxigênio (EROs).

A enzima SOD apresenta como função remover o radical superóxido convertendo-o em peróxido de hidrogênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995). Como pode ser observado na Figura 2, a atividade da enzima aumentou no tecido renal após tratamento com NE-TTO se comparado ao grupo controle.

Figura 2 Efeitos dos sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre a atividade da enzima superóxido dismutase no fígado, baço, pulmão e rim

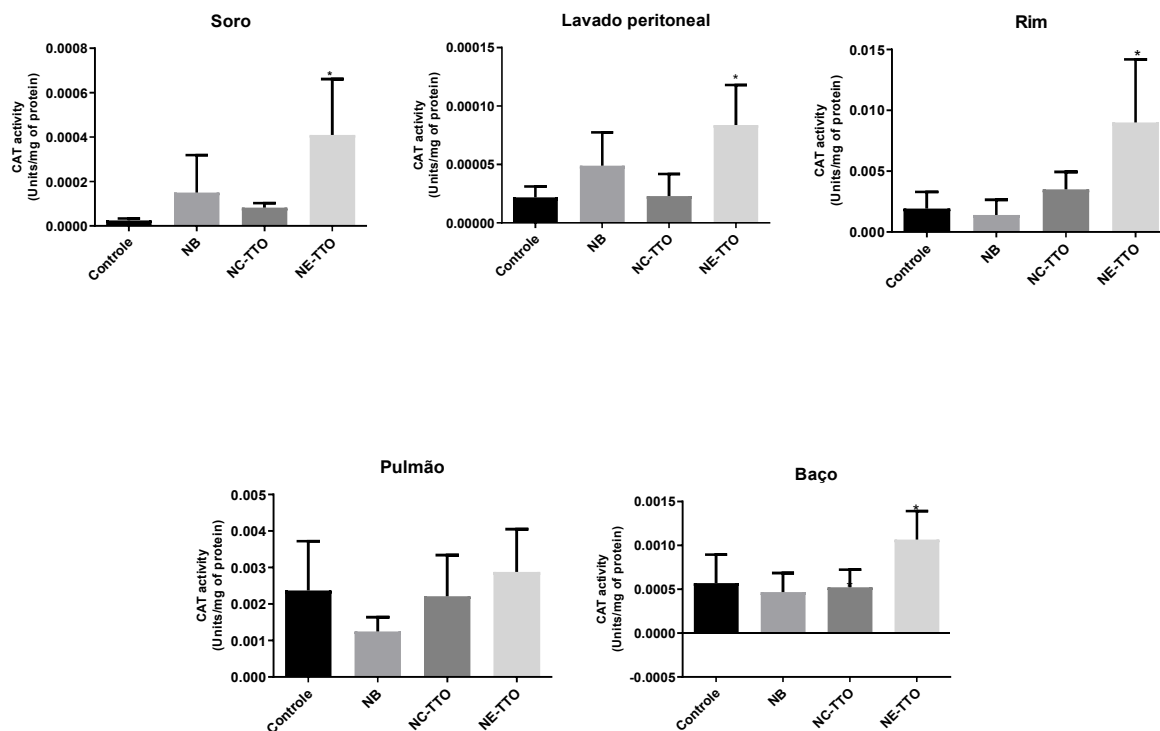


Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n=5). Avaliada por Teste t de Student.

* $p < 0,05$

A atividade da enzima catalase (CAT) também foi investigada. A CAT, uma heme-proteína, tem peróxido de hidrogênio como único substrato, estando sua atividade intimamente relacionada com a concentração desta EROs. Esta enzima atua minimizando a produção do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) a partir do peróxido de hidrogênio (IWASE et al., 2013). Os resultados obtidos (Figura 3) indicam aumento da atividade da enzima no lavado peritoneal (NE-TTO), soro (NE-TTO e NC-TTO) e rim (NE-TTO) comparados ao grupo controle.

Figura 3 Efeitos dos sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre a atividade da enzima catalase no lavado peritoneal, soro, baço, pulmão e rim no modelo *in vivo* de CLP



Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n=5). Avaliada por Teste t de Student.
* $p < 0,05$

Com esses resultados, observamos um incremento das atividades das enzimas principalmente no tecido renal, o que sugere proteção do perfil oxidante da sepse nesse órgão, a partir do sistema antioxidante enzimático SOD/CAT.

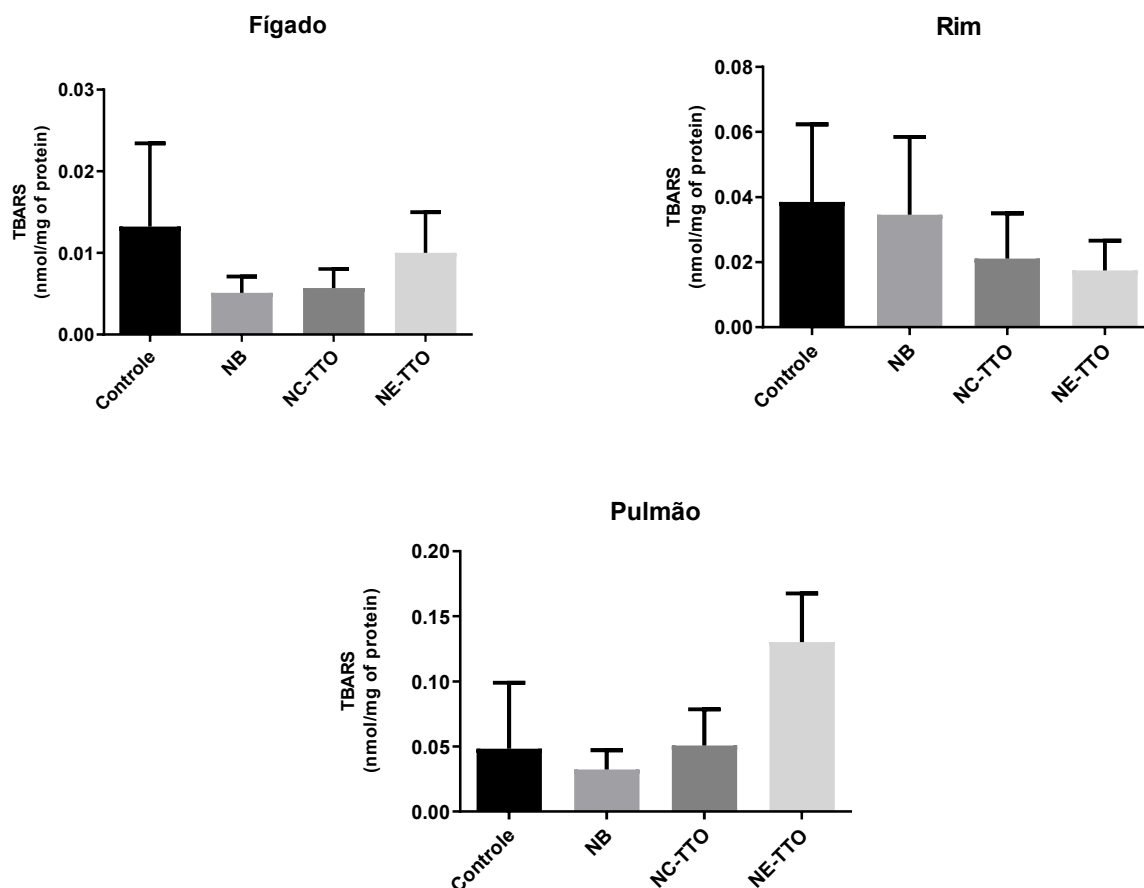
Para evitar os danos causados pelas EROs, o organismo desenvolveu vários mecanismos de defesa, chamados de antioxidantes. Os antioxidantes são classificados como enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático é o primeiro a agir, evitando o acúmulo de ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. O sistema enzimático é formado por diversas enzimas, destacando-se a SOD e a CAT (RENZ, 2003). O balanço entre a produção de H_2O_2 pela superóxido dismutase (SOD) e sua degradação pela catalase (CAT) é muito importante para evitar a geração do radical hidroxila pela reação de Fenton (ANDRADES et al., 2005).

2.1.3 Peroxidação lipídica

Por meio do ensaio de TBARS pode-se avaliar, de maneira indireta e inespecífica, a peroxidação lipídica pela quantificação do malondialdeído formado, que é proveniente do rompimento da membrana celular (JANERO, 1990). Acredita-se que a peroxidação lipídica mediada por EROs seja um importante causa de destruição e danos às membranas celulares, uma vez que os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares são degradados por este processo com conseqüente rompimento da integridade da membrana. A peroxidação da membrana pode levar a alterações na fluidez e permeabilidade da membrana e também a taxas aumentadas de degradação de proteínas e estas eventualmente levarão a lise celular (GARCÍA et al., 1997; ŞENER et al., 2005)

A peroxidação lipídica nos tecidos hepático, pulmonar e renal foi investigada. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 4. A administração de NE-TTO ou NC-TTO não apresentou diferença significativa na redução desse marcador nos tecidos em comparação com o grupo controle (solução salina). Portanto, a não alteração neste parâmetro indica que NE-TTO e NC-TTO preservaram a integridade da membrana celular dos órgãos induzidos por sepse.

Figura 4 Efeitos dos sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre a peroxidação lipídica no tecido hepático, pulmonar e renal do modelo *in vivo* CLP.



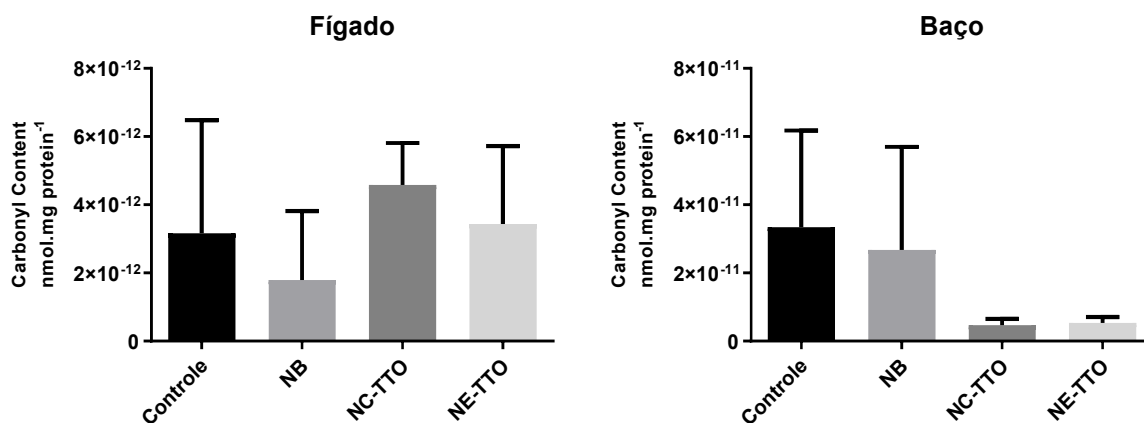
Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n=5). Avaliada por Teste t de Student.
Dano a proteínas

2.1.4 Carbonilação de proteínas

A oxidação de proteínas por espécies reativas leva à formação de derivados carbonílicos. Grupamentos carbonila (aldeídos e cetonas) são produzidos principalmente pela clivagem de proteínas ou pela oxidação direta das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos (principalmente Thr, Lys, Arg e Pro). Os grupamentos carbonila também podem ser formados pela reação de aldeídos (incluindo aqueles gerados durante a peroxidação lipídica) com proteínas. O uso de grupamentos carbonila como biomarcadores de estresse oxidativo apresenta algumas vantagens, como por exemplo, a relativa formação precoce e a estabilidade de proteínas carboniladas (DALLE-DONNE et al., 2003)

Na Figura 5 estão representados os resultados obtidos neste estudo. Com relação aos efeitos da oxidação proteica não houve diferença significativa em nenhum tecido.

Figura 5 Efeitos dos sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre a oxidação proteica no fígado, pulmão, baço e rim do modelo *in vivo* CLP.



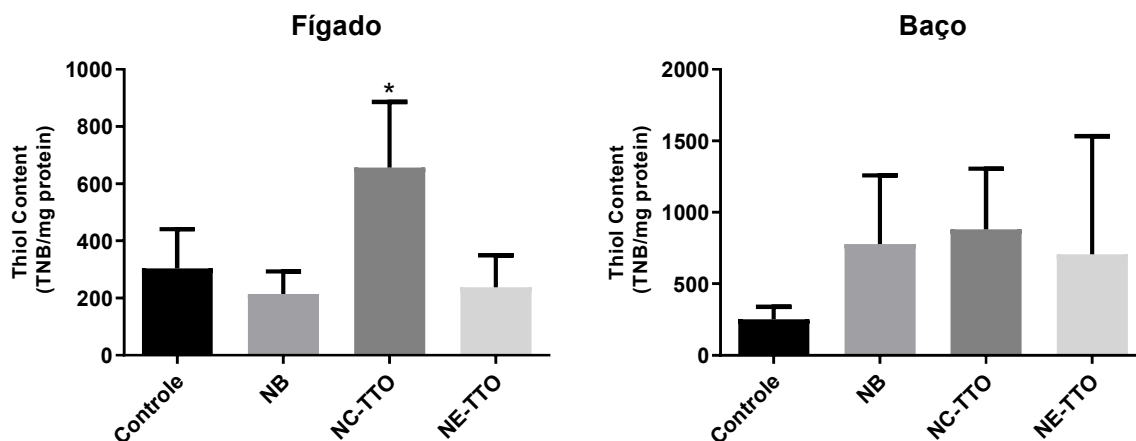
Dados expressos em média ± erro padrão da média (n=5). Avaliada por Teste t de Student.

Não foram observadas alterações de proteínas carbonilas dos grupos tratados, ou seja, não houve aumento do dano proteico nos grupos tratados.

2.1.5 Oxidação de grupamentos sulfidríla

Os compostos tiólicos são antioxidantes que apresentam em sua estrutura o grupamento sulfidríla, os quais são capazes de captar os radicais livres, especialmente quelando íons metálicos (WLODEK, 2010). Os resultados obtidos indicaram que o conteúdo tiólico total foi alterado no fígado (Figura 6).

Figura 6 Efeitos dos sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre a oxidação de grupamentos sulfidríla no fígado, pulmão, baço e rim do modelo *in vivo* CLP.



Dados expressos em média \pm erro padrão da média (n=5). Avaliada por Teste t de Student. * $p < 0,05$

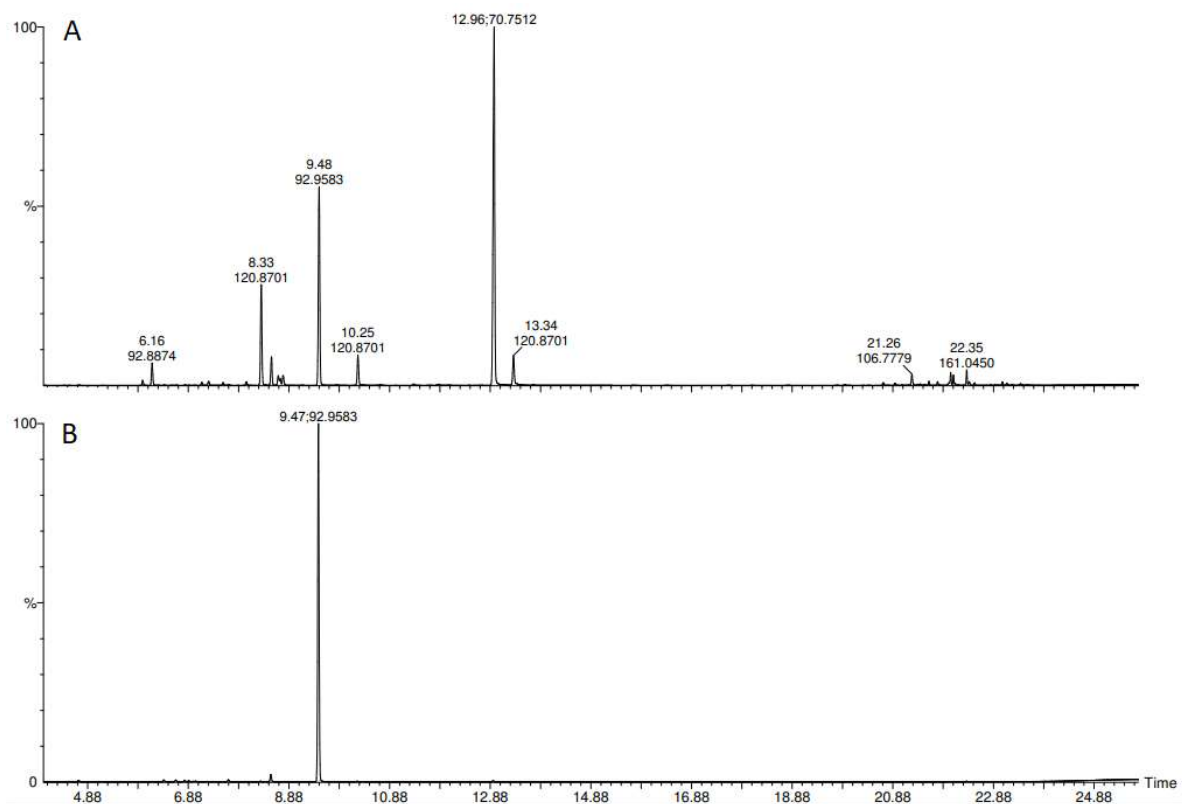
Um aumento significativo de grupamentos sulfidríla foi observado no tecido hepático tratado com NC-TTO em relação ao grupo controle (solução salina) ($p < 0,05$). Estes resultados sugerem um potencial aumento da defesa antioxidante nestes órgãos. A quantificação da concentração de grupos sulfidríla fornece uma ideia de ataque oxidativo a proteínas e, consequentemente, do nível de defesa antioxidante (HALLIWELL et al, 1989).

REFERÊNCIAS

- ANDRADES, M. et al. Oxidative Parameters Differences during Non-Lethal and Lethal Sepsis Development I. **Journal of Surgical Research**, v. 125, n. 1, p. 68–72, maio 2005.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, ago. 2004.
- CALDEFIE-CHÉZET, F. et al. Anti-inflammatory Effects of Melaleuca alternifolia Essential Oil on Human Polymorphonuclear Neutrophils and Monocytes. **Free Radical Research**, v. 38, n. 8, p. 805–811, ago. 2004.
- CARSON, C. F. et al. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 35, n. 3, p. 421–424, jun 1995.
- CAVALLI, R. et al. THE EFFECT OF ALCOHOLS WITH DIFFERENT STRUCTURES ON THE FORMATION OF WARM O/W MICROEMULSIONS. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 17, n. 7, p. 717–734, jan. 1996.
- COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 492–497, set. 2001.
- DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1–2, p. 23–38, mar. 2003.
- DORMAN, H. J.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308–16, fev. 2000.
- GARCÍA, J. J. et al. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. **FEBS Letters**, v. 408, n. 3, p. 297–300, jun 1997.
- IWASE, T. et al. A simple assay for measuring catalase activity: a visual approach. **Scientific reports**, v. 3, p. 3081, out. 2013.
- LAIGHT, D. W. et al. Assessment of myeloperoxidase activity in renal tissue after ischemia/reperfusion. **European journal of pharmacology**, v. 292, n. 1, p. 81–8, nov. 1994.
- LIU, C.-H.; WU, C.-T. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 353, n. 2–3, p. 149–156, jan. 2010.
- MOJAHEDIAN, M. M. et al. A novel method to produce solid lipid nanoparticles using n-butanol as an additional co-surfactant according to the o/w microemulsion quenching technique. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 174, p. 32–38, set. 2013.
- PRAUCHNER, C. A. Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. **Burns**, v. 43, n. 3, p. 471–485, maio 2017.
- PRAUCHNER, C. A.; PRESTES, A. DE S.; DA ROCHA, J. B. T. Effects of diphenyl diselenide on oxidative stress induced by sepsis in rats. **Pathology - Research and Practice**, v. 207, n. 9, p. 554–558, set. 2011.
- ŞENER, G. et al. Protective effect of β -glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. **International Immunopharmacology**, v. 5, n. 9, p. 1387–1396, ago. 2005.

APÊNDICE C

FIGURA 1 Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel (A) e do marcador químico γ -terpineno (B)



Para condições cromatográficas ver item 2.2, Capítulo 2

ANEXO

Figura 1 Laudo técnico óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel

Lote: 200	CAS Number: 68647-73-4
Fabricação: Agosto/2016	Validade: Agosto/2019

Itens Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido Limpido	Líquido Limpido
Cor	Amarelo Palha	Incolor a Amarelo Claro
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Característico	Característico
Densidade (20°C)	0,897	0,885 – 0,906
Índice de Refração (20°C)	1,478	1,470 – 1,482
Rotação Ótica	+ 8,76°	[+5° ; +15°]
Data da Análise	17/10/2016	
Resultado	Aprovado	
Origem	Austrália	
Extração	Destilação a vapor das folhas	
Principais Componentes (aprox.)	Terpinen-4-ol = 42% Alpha terpinene = 10% Terpinolene = 3% Alfa pineno = 3%	Gamma terpinene = 21% Cineol = 1% Alfa terpineol = 4% Para cimeno = 2%

Recomendações Especiais	
Mão-de-obra	Fungos mínimos. Não ingerir. Evitar contato do produto puro com olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água limpa em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Riscos	Produto inflamável a temperatura acima de 59°C. Perigo de fogo se exposto ao calor ou fonte de ignição. O líquido pode provocar irritação nos olhos, aparelho respiratório e digestivo. Polui as águas e o solo. O envio ao esgoto é proibido. As águas de combate ao fogo podem causar poluição.
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional/ industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número da ONU: 1169 / Classe: 3 / LÍQUIDO INFLAMÁVEL

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 043307/54