



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Milena Conci de Araujo

**Desenvolvimento de antisséptico nanoestruturado para controle de SARS-CoV-2**

Florianópolis  
2022

MILENA CONCI DE ARAUJO

**Desenvolvimento de antisséptico nanoestruturado para controle de SARS-CoV-2**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências (PPG BTC) da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Maraschin.

**Co-orientadora:** Dr<sup>a</sup>. Milene Dias Miranda (Fiocruz, RJ).

Florianópolis

2022

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

De Araujo, Milena Conci

Desenvolvimento de antisséptico nanoestruturado para controle de SARS-CoV-2 / Milena Conci De Araujo ; orientador, Marcelo Maraschin, coorientadora, Milene Dias Miranda, 2022.

124 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. SARS-CoV-2. 3. Antisséptico. 4. Compostos bioativos. 5. Carragenanas. I. Maraschin, Marcelo. II. Dias Miranda, Milene. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Milena Conci de Araujo

**Desenvolvimento de Antisséptico nanoestruturado para controle de SARS-CoV-2**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 08 de novembro de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Amanda Muliterno Domingues Lourenço de Lima  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Roniele Balvedi Iacovski Mibielli  
Laboratório Municipal de Florianópolis

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia e Biociências.

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Prof. Dr. Marcelo Maraschin  
Orientador

Florianópolis, 2022

Este trabalho é dedicado a todos aqueles que, assim como eu, vêm na ciência uma profunda forma de se relacionar com a natureza e o mistério da existência.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Marcelo Maraschin pela oportunidade de orientação, apoio, suporte e por suas falas impecáveis com as quais eu tanto aprendi. Como diz minha amiga Eva Regina, obrigada mestre!

À Beatriz Veleirinho e Leticia Mazzarino pela confiança no meu trabalho e por me permitirem crescer tanto com a experiência de estar dentro desta empresa incrível que é a NanoScoping. Mulheres, empreendedoras, pesquisadoras, mães e minhas grandes inspirações.

Aos meus grandes amigos da equipe NanoScoping, em especial ao João, Cynthia, Dani, Layla, David, Evelyn, Tanara, Léo, Dante, Thaisa e Eva. Gratidão imensa por partilhar meus dias com vocês e por todo auxílio, conversas, risadas, bolos... Sentirei saudades.

Às minhas amigas cariocas e à Fiocruz, em especial à minha coorientadora Dra. Milene Dias Miranda, Amanda, Alice e Vivian por me receberem tão bem no Rio de Janeiro e por todo empenho com o desenvolvimento deste projeto.

A todos os meus amigos do LMBV, em especial à Eva, Deise, Aline, Thaise, Alex, Lucas, Lauana, Camila e Isadora. Obrigada pela companhia e pelas trocas de experiências ao longo dessa louca jornada que é a pós-graduação. Sucesso a todos nós!

À CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa e apoio financeiro.

Ao programa de Biotecnologia e Biociências, à UFSC e a todos seus professores pelo enorme acolhimento e aprendizado.

Ao meu namorado Roger, por ter me acompanhado ao longo dessa trajetória e por toda sua compreensão, carinho, amor e cuidado. Há muito de ti na realização deste trabalho. Obrigada por tanto!

À toda minha família, em especial aos meus pais Luciana e Anderson por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todas as minhas decisões.

A todos os amigos que fiz em Florianópolis, os quais não estão citados nesta página, mas que fizeram parte direta ou indiretamente da minha trajetória ao longo deste dois anos.

Por fim, ao grande espírito e todos os meus mentores que naquele dia me levaram à inscrição num edital em que eu não conhecia o grupo, o orientador, o curso e nem a cidade. Gratidão infinita por me apresentar a melhor experiência da minha vida (até agora) e por me mostrar cada vez mais a força interna que existe em mim.

*“A ciência será sempre uma busca, jamais uma descoberta. É uma viagem, nunca uma chegada”.*

Karl Popper

## RESUMO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) determinou uma série de recomendações para conter o avanço e disseminação da COVID-19. Dentre elas, a higienização frequente das mãos foi amplamente recomendada, o que resultou no aumento do consumo de produtos antissépticos à base de álcool ou de outras moléculas sintéticas. Porém, quando utilizados em excesso, esses compostos podem trazer consequências adversas à saúde humana, como o desenvolvimento de dermatites, e para o ambiente, a exemplo da seleção de genótipos bacterianos resistentes. Uma das alternativas para combater este problema é a substituição dos antissépticos comuns por formulações à base de compostos bioativos naturais com atividade antimicrobiana/antiviral. Além disso, através da nanoestruturação das formulações é possível aumentar a biodisponibilidade, estabilidade, solubilidade e absorção dos bioativos em sistemas biológicos. O objetivo deste estudo foi desenvolver uma nanoemulsão de ação antisséptica à base de compostos bioativos naturais, com atividade virucida sobre o SARS-CoV-2. Para isso, nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A) foram preparadas, sendo a fase oleosa composta por óleo essencial, um ativo fenólico e seu respectivo solvente, enquanto a fase aquosa foi composta por carragenana e água purificada. Caracterizações físico-químicas e estudos de estabilidade foram desenvolvidos para avaliar a viabilidade das formulações ao longo do tempo. Além disso, as atividades bactericidas contra *Staphylococcus aureus* e virucida contra SARS-CoV-2 foram determinadas por ensaios *in vitro*. As caracterizações físico-químicas registraram valores médios de 150 nm de tamanho para as nanopartículas, PDI de 0,2 e potencial zeta em torno de -10,0 mV. A avaliação da estabilidade das nanoformulações indicou a ocorrência de *creaming* e sedimentação dependentes da concentração de quercetina utilizada. Além disso, os produtos apresentaram validade mínima de 3 meses e, em relação à atividade bactericida, as formulações evidenciaram concentração de inibição mínima de 1,25% para *S. aureus*. Nos ensaios de citotoxicidade e atividade virucida os produtos apresentaram 100% de inibição da replicação viral e se mostraram seguros para aplicação de uso tópico. Ao final, duas nanoformulações antissépticas de alta atividade virucida e grande potencial industrial foram desenvolvidas.

**Palavras-chave:** Higiene das mãos; antisséptico; compostos bioativos; flavonoides; nanotecnologia; SARS-CoV-2; COVID-19.



## ABSTRACT

The World Health Organization (WHO) has determined a series of recommendations to contain the advance and spread of COVID-19. Among them, frequent hand hygiene was widely recommended, resulting in an increased consumption of alcohol-based antiseptic products or synthetic molecules. However, when used in excess, these products can cause adverse consequences for human health, such as the development of dermatitis, as for the environment the selection of resistant bacterial genotypes. One of the alternatives to overcome this problem is the replacement of common antiseptics by formulations based on natural bioactive compounds with antimicrobial/antiviral activity. In addition, by nanostructuring formulations, it is possible to increase the bioavailability, stability, solubility and absorption of bioactives in biological systems. The objective of this study was to develop an antiseptic nanoemulsion based on natural bioactive compounds, aiming at the virucidal activity against SARS-CoV-2. For this, oil-in-water (O/W) nanoemulsions were prepared, being the oil phase composed of essential oil, a phenolic bioactive and its respective solvent, while the aqueous phase presented carrageenan and purified water. Physicochemical characterization and stability studies were developed to evaluate the viability of the formulations over time. In addition, bactericidal activities against *Staphylococcus aureus* and virucidal activity against SARS-CoV-2 were determined by *in vitro* assays. As a result, average values of 150 nm nanoparticle size were recorded, PDI of 0.2, and zeta potential around -10.0 mV. The stability of nanoformulations indicated the occurrence of quercetin-dependent creaming and sedimentation. In addition, the products showed a minimum validity of 3 months. Regarding the bactericidal activity, the formulations showed a minimum inhibition concentration of 1.25% for *S. aureus*. In the cytotoxicity and virucidal assays, the products showed 100% of viral replication inhibition and proved to be safe for topical application. In the end, two antiseptic nanoformulations with high virucidal activity and great industrial potential were developed.

**Keywords:** Hand hygiene; antiseptic; bioactive compounds; flavonoids; nanotechnology; SARS-CoV-2; COVID-19.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Detalhe da estrutura da molécula de quercetina.....	23
Figura 2. Detalhe da estrutura química da curcumina.....	24
Figura 3. Detalhe da estrutura molecular do resveratrol.....	25
Figura 4. Detalhe das estruturas químicas das moléculas de $\iota$ -, $\kappa$ - e $\lambda$ -carragenana.....	26
Figura 5. Solubilização da curcumina nos solventes avaliados (PEG, óleo de linhaça, ácido oléico e ácido cáprico.....	40
Figura 6. Solubilização do resveratrol nos solventes avaliados (PEG, óleo de linhaça, ácido oléico e ácido cáprico.....	40
Figura 7. Solubilização da quercetina nos solventes avaliados (PEG, óleo de linhaça, ácido oléico e ácido cáprico.....	40
Figura 8. Aspecto visual de nanoemulsões de quercetina, conforme as concentrações do composto ativo.....	43
Figura 9. Médias de tamanhos das nanopartículas em relação à concentração dos tensoativos Tween e Span.....	45
Figura 10. Médias de tamanhos das nanopartículas em relação à concentração de quercetina.....	46
Figura 11. Médias de tamanhos das nanopartículas em relação à concentração de PEG400..	47
Figura 12. Valores médios de PDI das nanoformulações em relação à concentração dos tensoativos Tween e Span.....	50
Figura 13. Valores médios de PDI das nanoformulações em relação à concentração de quercetina.....	50
Figura 14. Valores médios de PDI das nanoformulações em relação à concentração de PEG400.....	51
Figura 15. Valores médios do potencial zeta das nanoformulações em relação à concentração dos tensoativos Tween e Span.....	54
Figura 16. Valores médios do potencial zeta das nanoformulações em relação à concentração de quercetina.....	55
Figura 17. Valores médios do potencial zeta das nanoformulações em relação à concentração de PEG400.....	56
Figura 18. Médias do índice de instabilidade das nanoformulações em relação à concentração de tensoativos (Tween e Span).....	59

Figura 19. Valores médios do índice de instabilidade das nanoformulações em relação à concentração de quercetina.....	60
Figura 20. Médias do índice de instabilidade das nanoformulações em relação à concentração de PEG400.....	61
Figura 21. Perfis de transmitância da nanoformulação sem quercetina.....	62
Figura 22. Perfis de transmitância da nanoformulação contendo 0,1% de quercetina.....	62
Figura 23. Perfis de transmitância da nanoformulação contendo 0,25% de quercetina.....	63
Figura 24. Perfis de transmitância da nanoformulação contendo 0,5% de quercetina.....	63
Figura 25. Detalhe visual das nanoformulações com 0% de quercetina após incubação à 30°C.....	65
Figura 26. Detalhe visual das nanoformulações contendo 0,1% de quercetina após incubação à 30°C.....	66
Figura 27. Detalhe visual das nanoformulações com 0,25% de quercetina após incubação à 30°C.....	66
Figura 28. Aspecto visual das nanoformulações contendo 0,5% de quercetina após incubação à 30°C.....	67
Figura 29: Detalhe da aparência das nanoformulações com 0% de quercetina após incubação à 40°C.....	67
Figura 30. Aspecto das nanoformulações com 0,1% de quercetina após incubação à 40°C....	68
Figura 31. Aspecto visual das nanoformulações contendo 0,25% de quercetina após incubação à 40°C.....	68
Figura 32. Detalhe visual das nanoformulações com 0,5% de quercetina após incubação à 40°C.....	69
Figura 33. Percentual de inibição da replicação viral de SARS-CoV-2 <i>in vitro</i> pelos compostos bioativos livres em meio de cultura (não nanoencapsulados).....	73
Figura 34. Tamanho das nanopartículas da formulação A em relação à temperatura e tempo de incubação.....	76
Figura 35. Tamanho das nanopartículas da formulação B em relação à temperatura e tempo de incubação.....	76
Figura 36. Valores médios de PDI da nanoformulação A em relação à temperatura e tempo de incubação.....	78
Figura 37. Valores médios de PDI da nanoformulação B em relação à temperatura e tempo de incubação.....	79

Figura 38. Potencial zeta da nanoformulação A em relação à temperatura e tempo de incubação.....	81
Figura 39. Potencial zeta da nanoformulação B em relação à temperatura e tempo de incubação.....	81
Figura 40. Valores de potencial hidrogeniônico da nanoformulação A em relação à temperatura e tempo de incubação.....	83
Figura 41. Valores de pH da nanoformulação B em relação à temperatura e tempo de incubação.....	84
Figura 42. Correlação negativa entre os potenciais hidrogeniônico e zeta da nanoformulação A à 25°C.....	85
Figura 43. Correlação negativa entre pH e potencial zeta da nanoformulação B à 25°C.....	86
Figura 44. Detalhe visual do ensaio de concentração inibitória mínima da nanoformulação A, indicando MIC de 1,25%.....	88
Figura 45. Detalhe visual do ensaio de concentração inibitória mínima da nanoformulação B, indicando MIC de 1,25%.....	89
Figura 46. Valores médios de viabilidade celular de diferentes concentrações dos produtos em comparação ao grupo controle (sem tratamento).....	91
Figura 47. Valores médios de inibição da replicação de SARS-CoV-2 por FA, FB e solução 0,6% de ι-carragenana em diferentes concentrações no tratamento de 2 minutos.....	92
Figura 48. Valores médios de PFU/mL de SARS-CoV-2 apresentados por FA, FB e solução 0,6% de ι-carragenana em diferentes concentrações no tratamento de 2 minutos.....	93
Figura 49. Valores médios de inibição da replicação de SARS-CoV-2 por FA, FB e solução 0,6% de ι-carragenana em diferentes concentrações no tratamento de 10 minutos.....	94
Figura 50. Valores médios de PFU/mL de SARS-CoV-2 apresentados por FA, FB e solução 0,6% de ι-carragenana em diferentes concentrações no tratamento de 10 minutos.....	95
Figura 51. Comparação entre os valores médios de inibição da replicação viral apresentados por FA, FB e solução 0,6% de ι-carragenana em diferentes concentrações e nos tratamentos de 2 e 10 minutos de contato.....	96
Figura 52. Comparação entre os valores médios de quantidade PFU/mL apresentados por FA, FB e solução 0,6% de ι-carragenana em diferentes concentrações e nos tratamentos de 2 e 10 minutos de contato em relação ao grupo controle.....	97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das soluções aos ensaios de solubilidade.....	33
Tabela 2. Composição das emulsões (% m/v).....	34
Tabela 3. Tamanho das nanopartículas em relação à variação na concentração de tensoativos, quercetina e PEG400.....	44
Tabela 4. PDI de nanoformulações consoante à concentração de tensoativos, quercetina e PEG400.....	49
Tabela 5. Potencial zeta médio das nanoformulações em relação às concentrações de tensoativos (Tween 80 e Span 80), quercetina e PEG400.....	53
Tabela 6. Índice de instabilidade das nanoformulações, conforme as concentrações de tensoativos, quercetina e PEG400 estudadas.....	58
Tabela 7. Velocidade ( $\mu\text{m/s}$ e $\text{mm/dia}$ ) de separação das nanoformulações em relação à variação na concentração de tensoativos, quercetina e PEG 400.....	64
Tabela 8. Caracterização físico-química das nanoformulações de acordo com a concentração de $\kappa$ -carragenana em estudo.....	71
Tabela 9. Caracterização físico-química das nanoformulações de acordo com a concentração de $\lambda$ -carragenana.....	72
Tabela 10. Caracterização físico-química das nanoformulações de acordo com a concentração de $\iota$ -carragenana.....	73
Tabela 11. Composição das nanoformulações A e B.....	75
Tabela 12. Tamanho das nanopartículas (nm) das formulações em estudo, em função da temperatura e tempo de incubação.....	75
Tabela 13. Valores médios de PDI das nanoformulações em relação à temperatura e tempo de incubação.....	78
Tabela 14. Potencial zeta das nanoformulações A e B em relação à temperatura e tempo de incubação.....	80
Tabela 15. pH das nanoformulações A e B em relação à temperatura e tempo de incubação.....	83

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Classificação dos nanomateriais comumente utilizados para fins terapêuticos.....	28
Quadro 2. Atividade antiviral e solubilidade dos compostos bioativos candidatos.....	32

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Etapas do ensaio para avaliação do efeito virucida dos produtos sobre o vírus SARS-CoV-2.....	43
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{m/s}$  - Micrômetros por segundo;  
3CL<sup>pro</sup> - 3C-like protease;  
ACE2 - Enzima conversora de angiotensina 2;  
BSL3 - Laboratório de Biossegurança Nível 3;  
C+ - Controle positivo;  
C- - Controle negativo;  
CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças;  
CHIKV - Vírus Chikungunya;  
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*;  
CMV - Citomegalovírus;  
COVID-19 - Doença do Coronavírus 2019;  
DCA - Dermatite de contato alérgica;  
DCI - Dermatite de contato irritante;  
DENV - Vírus da Dengue;  
DENV-2 - Vírus da Dengue tipo 2;  
DMEM - Meio de cultura modificado *Dulbecco's*;  
EBOV - Vírus Ebola;  
H1N1 - Vírus Influenza A subtipo H1N1;  
HBV - Vírus da Hepatite B;  
HCoV - Coronavírus Humano NL63;  
HCV - Vírus da Hepatite C;  
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana;  
HPV - Papilomavírus Humano;  
HRV - Rinovírus Humano;  
HSV-1 - Vírus da Herpes Simples 1;  
HSV-2 - Vírus da Herpes Simples 2;  
IAV - Vírus Influenza A;  
IBV - Vírus da Bronquite Infecciosa Aviária;  
IFN- $\gamma$  - Interferon gama;  
IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 beta;  
IL-6 - Interleucina 6;  
IL-4 - Interleucina 4;



IL-17 - Interleucina 17;  
INPs - Intervenções não farmacêuticas;  
M<sup>pro</sup> - *Main protease*;  
m/V - Massa por volume;  
MERS-CoV - Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio;  
MIC – *Minimum Inhibitory Concentration*;  
mm - Milímetros;  
mm/dia - Milímetros por dia;  
MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina;  
mV - Milivolt;  
nm - Nanômetros;  
O/A - Óleo em água;  
OMS - Organização Mundial da Saúde;  
OXA - Oxacilina;  
PBS - Tampão fosfato salino;  
PdI - Índice de polidispersão;  
PFU - Unidade formadora de placa;  
PEG400 - Polietilenoglicol 400;  
PL<sup>pro</sup> - *Papain-like cysteine protease*;  
RSV - Vírus sincicial respiratório;  
S - Proteína S;  
SARS-CoV - Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave;  
SARS-CoV-2 - Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2;  
SFB - Soro fetal bovino;  
Span 80 - Oleato de sorbitan;  
TGF-β - Fator de transformação do crescimento beta;  
Th1 - Linfócito Th1;  
Th17 - Linfócito Th17;  
Tween 80 - Polissorbato 80;  
v/v - Volume por volume;  
Vero E6 - Célula de rim de macaco verde africano;  
VV- Vírus Vaccinia.

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\iota$  - Iota;

$\kappa$  - Kappa;

$\lambda$  - Lambda;

$\pm$  - Mais ou menos;

® - Marca registrada;

$\geq$  - Maior ou igual;

$\leq$  - Menor ou igual;

$>$  - Maior;

$<$  - Menor;

% - Percentual.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	21
1.1 SARS-CoV-2 e a pandemia da COVID-19	21
1.2 A importância da higienização das mãos e o uso de antissépticos na pandemia da COVID-19	23
1.3 O potencial terapêutico e anti-coronavírus de compostos bioativos naturais	26
1.3.1 Quercetina e curcumina	26
1.3.2 Resveratrol	28
1.3.3 Carragenanas	29
1.4 Nanotecnologia, compostos bioativos e o combate à COVID-19.	31
<b>2. HIPÓTESE DE PESQUISA</b>	34
<b>3. OBJETIVOS</b>	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	35
4.1 Material	35
4.2 Estudo das formulações	35
4.2.1 Triagem de compostos bioativos e testes de solubilidade	35
4.2.2 Preparo das nanoemulsões	37
4.2.3 Caracterização físico-química das nanoemulsões	39
4.2.4 Estudo de estabilidade acelerada e estresse térmico	39
4.2.5 Incorporação de carragenana	40
4.2.6 Estudo paramétrico da estabilidade físico-química	40
4.3 Avaliação da eficácia e ensaios <i>in vitro</i>	41
4.3.1 Teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC)	41
4.3.2 Ensaio de citotoxicidade e atividade contra o SARS-CoV-2	41
4.4 Análises estatísticas	43
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	44
5.1 Estudo das formulações	44
5.1.1 Triagem de compostos bioativos, testes de solubilidade e preparo das nanoemulsões	44
5.1.2 Caracterização físico-química das nanoemulsões	48
5.1.2.1 Tamanho das nanopartículas	48

5.1.2.2 PDI	52
5.1.2.3 Potencial Zeta	56
5.1.3 Estudo de estabilidade acelerada e estresse térmico	60
5.1.4 Incorporação de carragenana	73
5.1.4.1 $\kappa$ -carragenana	74
5.1.4.2 $\lambda$ -carragenana	75
5.2.4.3 $\iota$ -carragenana	75
5.1.5 Estudo da estabilidade físico-química de nanoformulações	78
5.2 Avaliação da eficácia e ensaios <i>in vitro</i>	90
5.2.1 Teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC)	90
5.2.2 Ensaio de citotoxicidade e atividade contra o SARS-CoV-2	93
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>100</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	<b>101</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 SARS-CoV-2 e a pandemia da COVID-19

O ano de 2020 foi um marco na história da saúde pública mundial. Bastaram poucos meses para que uma nova doença infecciosa se propagasse pelo mundo inteiro, impactando na vida de bilhões de pessoas. Em 31 de dezembro de 2019, o escritório da Organização Mundial da Saúde (OMS) na China foi informado da ocorrência de casos de uma pneumonia de etiologia desconhecida na província de Hubei, cidade de Wuhan, China. Um total de 44 casos foram relatados, sendo a sintomatologia caracterizada por febre, dor de cabeça, tosse seca, dificuldade para respirar e lesões nos pulmões (WHOa, 2020; ZHOU *et al.*, 2020). Nesta mesma data, o Centro Chinês para Controle e Prevenção de doenças (CDC) deu início ao acompanhamento dos casos e investigações a respeito da origem e epidemiologia da doença (ZHU *et al.*, 2020).

Logo no começo de 2020, o agente responsável pelo surto foi isolado e identificado como um novo tipo de coronavírus, inicialmente denominado 2019-nCoV, causador da doença respiratória aguda (ZHU *et al.*, 2020). Esse processo facilitou o desenvolvimento de diagnósticos moleculares, possibilitando um maior rastreamento de indivíduos infectados (ZHENG, 2020). O estudo dos casos e os relatos dos pacientes indicaram uma estreita relação entre a doença e a exposição destes em ambiente de mercado de frutos do mar, em Wuhan, China (WHOb, 2020), sugerindo uma possível transmissão zoonótica. De acordo com dados disponibilizados pela OMS, ao final de janeiro de 2020 os números da doença chegavam a 9.826 casos confirmados e 213 mortes, tendo um aumento progressivo de, em média, 200 novos casos por dia. Porém, este número começou a aumentar para 400, 600 e 800 novos casos em diversos países (WHOc, 2020). Devido à rapidez com que a doença se disseminava e ao aumento diário no número de casos confirmados e óbitos, os indicativos eram de que uma grande crise de saúde pública mundial se aproximava.

Em fevereiro de 2020, a OMS passou a chamar a doença de COVID-19, uma abreviação para “*Coronavirus Disease 2019*”, enquanto o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus denominou o agente causador como SARS-CoV-2, referente a “*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*” (ICTV, 2020; WHOd, 2020). A família *Coronaviridae* (subfamília *Orthocoronavirinae*) é composta por vírus envelopados de RNA fita simples com sentido positivo - (+)ssRNA - e genomas de cerca de 27,6-31 kb, sendo agrupados em quatro gêneros: alfa-, beta-, gama- e delta-coronavírus (DECARO & LORUSSO, 2020). De modo geral, mamíferos são hospedeiros para alfa- e beta-coronavírus, enquanto gama- e delta- possuem,

principalmente, hospedeiros aviários (SU *et al.*, 2016). Análises filogenéticas classificaram o SARS-CoV-2 como um Betacoronavírus, pertencente ao subgênero Sarbecovírus e de alta semelhança com cepas derivadas de morcegos (LU *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020).

Nas últimas décadas, dois outros coronavírus altamente patogênicos foram causadores de epidemias, como no caso do SARS-CoV em 2002, agente da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), e do MERS-CoV em 2011, agente da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS). Ambos os vírus são apontados como tendo uma origem zoonótica, sendo os morcegos os seus ancestrais mais prováveis (DECARO & LORUSSO, 2020). Este processo de transferência do patógeno entre hospedeiros é observado porque os vírus não possuem uma boa adaptação em humanos e sua alta taxa de recombinação gênica permite que sua propagação ocorra via outros reservatórios biológicos ou hospedeiros intermediários, como os animais silvestres (SU *et al.*, 2016). Para alguns autores, a ocorrência de três surtos causados por coronavírus em cerca de 20 anos ilustra a relação desarmônica que a humanidade vem tendo com o mundo natural. Decaro e Lorusso (2020) ressaltam que o surgimento de cepas patogênicas como o SARS-CoV-2 resulta de práticas não sustentáveis da agricultura moderna e da urbanização desenfreada, os quais levam à perda de habitat e desequilíbrio de ecossistemas dos animais silvestres e, conseqüentemente, facilitam o contato de humanos com vírus desconhecidos. Partindo da mesma perspectiva, Zoumpourlis *et al.* (2020) defendem que, neste caso, deve-se adotar uma abordagem holística, considerando a causalidade dos surtos e não apenas as medidas restritivas de saúde pública, uma vez que as epidemias se instauram, pois, assim é possível prevenir a perda de vidas humanas. Os autores ressaltam que tais crises de saúde pública refletem a urgência de repensarmos nossa relação com o ambiente.

Há 6 anos, Su *et al.* (2016) descreviam os frequentes eventos de recombinação gênica dos coronavírus e a alta quantidade de CoVs circulantes em ambientes naturais, o que levou os autores a se perguntarem não se, mas quando seria o novo surto causado por estes agentes. Foi então que no dia 11 de março de 2020, cerca de 3 meses desde o primeiro relato da doença e com 118.319 casos confirmados e 4292 mortes, a OMS caracterizou a COVID-19 como uma pandemia (WHOe, 2020). A magnitude do surto está diretamente relacionada à alta transmissibilidade da doença. A infecção viral ocorre por meio dos receptores celulares ACE2 (enzima conversora da angiotensina 2), os quais estão presentes em várias linhagens celulares, mas principalmente no epitélio respiratório (LU *et al.*, 2020). Assim como outras doenças infecciosas respiratórias, o vírus é transmitido por contato físico, aerossóis e fômites provenientes de pessoas portadoras, mantendo-se viável e infeccioso por horas e até mesmo dias (CHAN *et al.*, 2020; VAN DOREMALEN *et al.*, 2020). Além disso, um dos agravantes à

alta disseminação da doença é a ocorrência de transmissão através de casos assintomáticos ou pré-sintomáticos (ROTHER *et al.*, 2020; ZOU *et al.*, 2020).

A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre de dois modos: direta ou indiretamente. O contato direto refere-se a situações em que há o toque físico na pessoa portadora do vírus, como um aperto de mão ou abraço, enquanto o modo indireto refere-se à transmissão por meio de objetos ou locais contaminados - denominados fômites. Ainda no contato indireto, a transmissão pode ocorrer via aerossóis, ou seja, partículas aéreas advindas do trato respiratório que, em um indivíduo portador do vírus, podem passar de pessoa para pessoa através da tosse, espirro e até mesmo fala (ASADI *et al.*, 2020). Perante este cenário, recomendações foram estabelecidas pela OMS para prevenir e controlar o avanço da doença, a saber: distanciamento social de no mínimo 1 metro, uso de máscara facial ao ter contato com outras pessoas, evitar aglomerações, manter boa ventilação em locais fechados, evitar tocar nos olhos, boca e nariz, ao espirrar ou tossir, cobrir o nariz e boca, permanecer em casa sempre que possível, desinfetar superfícies, principalmente as tocadas com frequência e higienizar as mãos regularmente (WHO, 2020). Tais medidas são definidas pelo CDC dos Estados Unidos como intervenções não farmacêuticas (INFs), as quais englobam uma série de práticas individuais e coletivas que visam o controle da exposição a vírus respiratórios em cenários epidêmicos e/ou pandêmicos (CDC, 2017). A adoção das INFs é considerada fundamental no combate à disseminação do agente e, uma vez adotadas em conjunto com intervenções farmacêuticas, amplificam o retardamento das transmissões virais (CDC, 2017).

## **1.2 A importância da higienização das mãos e o uso de antissépticos na pandemia da COVID-19**

A higienização regular das mãos é definida como uma das INFs de proteção individual de fácil implementação (CDC, 2017). Durante a pandemia da COVID-19, essa prática foi amplamente empregada pela população mundial, em especial nos locais com maior circulação de pessoas, nos quais a aplicação de soluções à base álcool nas mãos foi estabelecida como um pré-requisito de acesso. Por conta disso, a demanda por antissépticos para higienização das mãos aumentou significativamente, de modo que muitos locais declararam baixa disponibilidade ou falta destes produtos (BERARDI *et al.*, 2020). O período também foi marcado por uma vasta circulação de informações nos veículos de comunicação em massa a respeito dos modos corretos de antisepsia, visando instruir tanto os trabalhadores da saúde, quanto a população em geral, a respeito dos impactos desta prática sobre a transmissão da

COVID-19 (ALZYOOD *et al.*, 2020). As iniciativas para implementar protocolos e práticas de higienização regular das mãos foram resultados de recomendações estabelecidas pelas OMS sobre a utilização de produtos antissépticos à base de álcool ou água e sabão para uma limpeza adequada (WHO, 2020). A eficácia desta intervenção já foi avaliada perante outros surtos de vírus respiratórios - como influenza - e demonstrou ser significativamente efetiva na prevenção de infecções (SAUNDERS-HASTINGS *et al.*, 2017).

Os produtos higienizadores de mãos são comercializados em forma de sabonetes líquidos ou em barras, géis, *sprays*, espumas e cremes antissépticos, os quais podem ser classificados em dois grupos: não alcoólicos e alcoólicos. As formulações sem álcool geralmente utilizam algum composto químico com propriedades antissépticas, como triclosan, clorexidina, cloroxilenol ou iodóforos, enquanto as formulações com álcool utilizam etanol, isopropanol, *n*-propanol, ou peróxido de hidrogênio (JING *et al.*, 2020). Os antissépticos para mãos mais vendidos no mercado global possuem álcool como base de sua formulação (PRADHAN *et al.*, 2020). Isto está relacionado à elevada ação biocida dos compostos alcoólicos, os quais agem na membrana ou envelope lipídico de bactérias e vírus - em especial os envelopados -, desencadeando a solubilização de lipídios, desnaturação de proteínas e lise, o que resulta na liberação do conteúdo intracelular - no caso das bactérias - e inativação da partícula viral (GUPTA & LIPNER, 2020; JING *et al.*, 2020). Uma vez que estes componentes estruturais são críticos aos vírus para os processos de fixação, penetração, biossíntese, maturação e lise, suas alterações resultam na interrupção do ciclo de vida e da transmissão viral (GOLIN *et al.*, 2020).

Embora a lavagem das mãos com água e sabão seja mais efetiva que a utilização de produtos antissépticos, estes são fundamentais para situações em que não há a disponibilidade de equipamentos de lavagem (GOLIN *et al.*, 2020; WHO, 2020). Contudo, o uso extensivo desses agentes pode acarretar uma série de consequências à saúde humana e ao ambiente. Quando em contato excessivo com a superfície da mão, os produtos à base de álcool podem levar à desnaturação de proteínas do estrato córneo e a perda de lipídios intercelulares, além de remover a oleosidade natural da pele e facilitar a ruptura das barreiras cutâneas, resultando em alterações celulares e desidratação, além de impactar diretamente na microbiota natural da pele (GUPTA & LIPNER, 2020; LARSON *et al.*, 1998; PRADHAN *et al.*, 2020; TAN & OH, 2020). Essas alterações também aumentam a exposição do organismo à entrada de patógenos e, conseqüentemente, facilitam o desenvolvimento de infecções bacterianas e dermatites (PRADHAN *et al.*, 2020; RUNDLE *et al.*, 2020). As patologias mais comuns associadas ao uso destes agentes são a Dermatite de Contato Irritante (DCI) e a Dermatite de Contato Alérgica



(DCA). A DCI é desencadeada por contatos de irritação, os quais causam queimação e ardência na pele, enquanto a DCA é causada por contatos com alérgenos e tem como principal sintoma o prurido (TAN & OH, 2020).

Em geral, os ativos dos antissépticos às mãos, sejam eles à base de álcool ou não, são considerados irritantes químicos, juntamente com os demais constituintes, como fragrâncias, surfactantes e conservantes, o que também aumenta a possibilidade de reações alérgicas (RUNDLE *et al.*, 2020). Com o rompimento das barreiras cutâneas, a absorção destes agentes é facilitada, podendo desencadear uma série de cascatas inflamatórias (TAN & OH, 2020). Paula et al. (2017) relatam que muitos desses produtos não são testados quanto às suas possíveis interações, uma vez que sua eficácia está atrelada às complexas interações entre os ativos e a camada córnea da pele. Os autores salientam que a utilização inadequada pode, inclusive, intensificar as reações adversas. Outros fatores como o tempo de contato, umidade, fricção, clima frio e seco, juntamente com a predisposição do indivíduo, também devem ser considerados (BHATIA *et al.*, 2020). Deste modo, a preferência deve ser dada por produtos sem fragrâncias, corantes ou agentes potencialmente irritantes, em conjunto com a utilização de formulações que possuam compostos umectantes, lipídios ou óleos em suas composições (PAULA *et al.*, 2017; PRADHAN *et al.*, 2020).

Já em relação às implicações ambientais do uso de antissépticos comuns, grande parte destes produtos apresenta algum grau de toxicidade vinculada à sua produção e/ou descarte, uma vez que, além do álcool, algumas formulações possuem derivados de petroquímicos em sua composição, os quais são considerados tóxicos ao ambiente (DAVEREY & DUTTA, 2020; MAHMOOD *et al.*, 2020). Além disso, a presença destes compostos em águas residuais, principalmente em esgotos domésticos e hospitalares, contribui para a seleção e disseminação de cepas bacterianas resistentes (BAQUERO *et al.*, 2008). Partindo da mesma ideia, Mahmood et al. (2020) ressaltam que a utilização excessiva de antissépticos à base de álcool pode viabilizar ainda mais o processo de seleção de genótipos resistentes e sobrecarregar os profissionais de saúde, os quais já lutam há tempos contra microrganismos resistentes e infecções adquiridas no ambiente hospitalar.

Perante este cenário, métodos alternativos de desinfecção se fazem extremamente necessários. Berardi et al. (2020) acreditam que a conscientização da população em relação à higienização das mãos permanecerá na era pós-COVID-19 e terá efeitos a longo prazo que se estenderão por todo o mundo. Já Jones et al. (2020) salientam que as práticas adotadas para conter o avanço do SARS-CoV-2 impactaram diretamente na dinâmica de outros vírus respiratórios comuns, como o vírus sincicial respiratório (RSV) e influenza. Os autores

inclusive alertam para a possibilidade de grandes surtos destes agentes no futuro, o que ressalta ainda mais a urgência em se obter soluções inovadoras para agregar ao combate da dispersão destes patógenos no ambiente.

### **1.3 O potencial terapêutico e anti-coronavírus de compostos bioativos naturais**

A pandemia da COVID-19 e o conseqüente aumento na frequência de higienização das mãos evidenciaram a carência de métodos alternativos à desinfecção segura e sustentável. Um dos caminhos para combater este problema é a substituição dos antissépticos comuns por produtos que contenham ativos naturais, uma vez que a utilização de moléculas bioativas previamente selecionadas pela natureza apresenta uma série de vantagens quando comparadas às sintéticas. Os processos de coevolução entre seres vivos em milhões de anos resultaram na formação de potentes entidades químicas de interesse à saúde humana. Os metabólitos secundários de plantas, algas e microrganismos desempenham importantes papéis ecológicos, como defesa contra patógenos e atração de organismos polinizadores (BRUSOTTI *et al.*, 2014). Porém, ao tratar de aplicações de interesse à saúde humana, esses metabólitos são conhecidos por apresentarem uma série de propriedades terapêuticas, como atividades antiviral, antifúngica, antimicrobiana e anti-inflamatória, entre outros (DAVEREY & DUTTA, 2020). Como são produzidos por vias metabólicas compartilhadas entre os seres vivos, os compostos bioativos apresentam uma maior compatibilidade biológica se comparados a moléculas sintéticas, além de serem biodegradáveis e não tóxicos ao ambiente (HARVEY *et al.*, 2015; DAVEREY & DUTTA, 2020). Neste cenário, algumas classes de compostos vêm chamando atenção de diversos pesquisadores por suas amplas atividades antivirais, a saber: quercetina, curcumina, resveratrol e carragenanas.

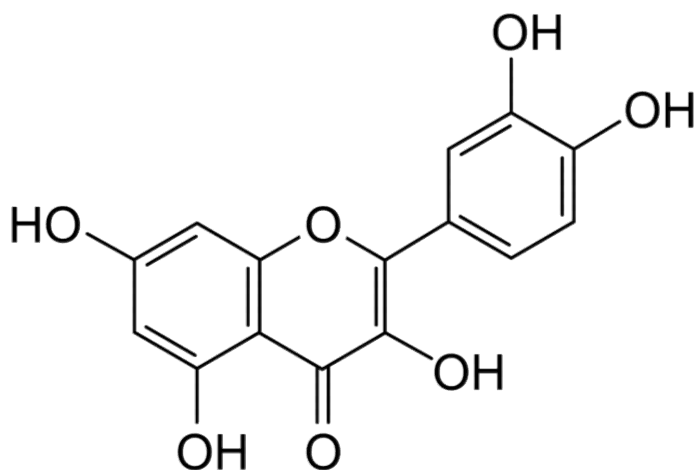
#### **1.3.1 Quercetina e curcumina**

Os flavonoides são polifenóis de caráter pleiotrópico, os quais apresentam uma série de propriedades farmacológicas e, por isso, são considerados agentes promissores para o desenvolvimento de novos produtos, em especial, aqueles com ação antimicrobiana e antiviral (RUSSO *et al.*, 2020). Dentro deste grupo, destacam-se dois compostos que são alvos constantes de pesquisas de bioprospecção: a quercetina e a curcumina. Análises *in silico* e *in vitro* demonstraram que ambas as moléculas possuem uma alta capacidade de ligação a proteínas envolvidas com o ciclo viral do SARS-CoV e SARS-CoV-2, apresentando

propriedades anti-infectivas e anti-replicativas (ABIAN *et al.*, 2020; BIANCATELLI *et al.*, 2020; ZAHEDIPOUR *et al.*, 2020).

A quercetina (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxi-flavona) é um flavonoide de cor amarela, solúvel em álcool e lipídios e insolúvel em água, o qual é amplamente encontrado em frutas e vegetais consumidos na dieta humana, e.g., brócolis, maçã, cebola, tomate, trigo, nozes, cereja, amora, entre outros (DAVID *et al.*, 2016). O consumo da quercetina está associado a práticas terapêuticas tradicionais, uma vez que o composto apresenta propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antivirais, antimicrobianas, pró-metabólicas, cardio- e neuroprotetoras, além de seus efeitos preventivos contra o câncer (DAVID *et al.*, 2016; DEROSA *et al.*, 2020). Em relação ao SARS-CoV-2, análises *in silico* demonstram que a quercetina apresenta um grande potencial de inibição das proteases virais 3CL<sup>pro</sup> e PL<sup>pro</sup>, além do potencial de ligação com a interface da proteína viral S e o receptor celular ACE2, limitando os processos de reconhecimento viral pelas células hospedeiras e interrompendo as interações entre células e vírus (DEROSA *et al.*, 2020). O potencial farmacológico da quercetina também tem sido avaliado como forma de tratamento de outras doenças induzidas pela COVID-19, como a lesão renal aguda (DINIZ *et al.*, 2020; GU *et al.*, 2021).

**Figura 1:** Detalhe da estrutura da molécula de quercetina.

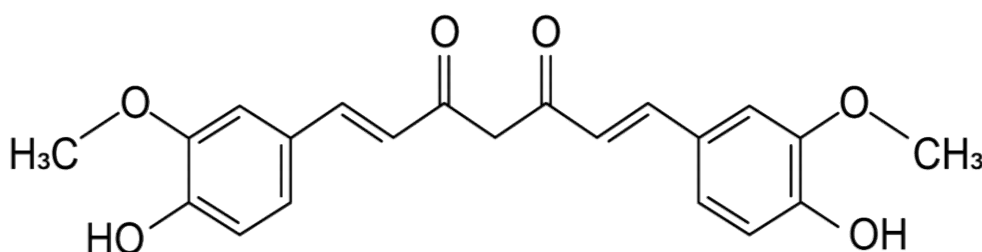


Fonte: A autora.

Por sua vez, a curcumina [1, 7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1, 6-heptadieno-3,5-diona] é um flavonoide isolado dos rizomas de *Curcuma longa* (L) e outras espécies do gênero, sendo muito utilizada como aditivo alimentar e corante por conta de sua cor amarela (LESTARI & INDRAYANTO, 2014). É um composto insolúvel em soluções aquosas e solúvel em solventes

orgânicos e lipídios (KOTHA & LUTHRIA, 2019). Além disso, apresenta propriedades antivirais, anti-nociceptivas, antioxidantes, antipiréticas, anti-apoptóticas e, principalmente, anti-inflamatórias, sendo considerada um composto com grande potencial terapêutico com aplicações em doenças cardiovasculares, câncer e diabetes (KOTHA & LUTHRIA, 2019; BABAEI *et al.*, 2020). Em relação ao SARS-CoV-2, análises *in silico* indicam que a curcumina possui um alto potencial de ligação com o receptor celular humano ACE2 e as proteínas virais S e 3CL<sup>pro</sup> (M<sup>pro</sup>), os quais são cruciais para o ciclo infeccioso do vírus nas células (MAURYA *et al.*, 2020; RAJAGOPAL *et al.*, 2020; ZAHEDIPOUR *et al.*, 2020). Em um estudo realizado por Wen *et al.* (2007), análises *in vitro* demonstraram que a curcumina apresenta atividade antiviral contra o SARS-CoV, o qual possui diversas semelhanças com o SARS-CoV-2 e, sendo assim, é considerada uma potencial molécula ao desenvolvimento de fármacos (WEN *et al.*, 2007). Porém, para além de seus efeitos antivirais, o composto tem sido avaliado como agente complementar no tratamento de COVID-19 por conta de suas propriedades anti-inflamatórias, além de apresentar aplicações no combate à deficiência pulmonar característica da doença (VALIZADEH *et al.*, 2020; RATTIS *et al.*, 2021).

**Figura 2:** Detalhe da estrutura química da curcumina.



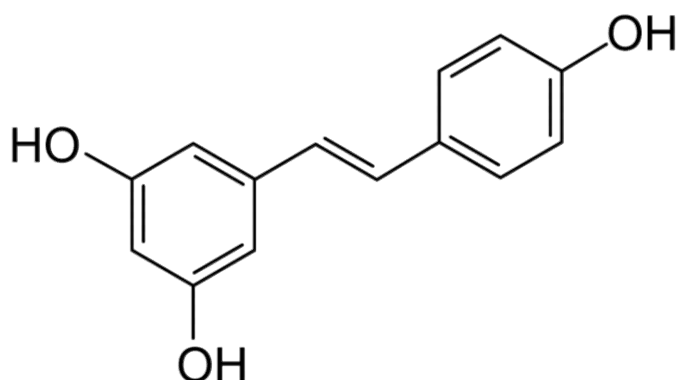
Fonte: A autora.

### 1.3.2 Resveratrol

Outro componente da família dos polifenóis que também tem sido considerado um agente promissor contra o SARS-CoV-2 é o resveratrol (3, 5, 4'-*trans*-trihidroxiestilbeno). Esta molécula é lipofílica e lipossolúvel, com baixa solubilidade em água e sensível à degradação química, por luz ultravioleta, pH alcalino, enzimática e temperaturas altas (CHUNG *et al.*, 2019; GALINIAK *et al.*, 2019). Extraído de raízes, caules, folhas, frutos e sementes, o resveratrol é encontrado em cerca de 34 famílias vegetais e 100 espécies, dentre as quais estão as uvas, amoras, amendoim, vinho tinto, entre outros (RATZ-ŁYKO & ARCT, 2018; TIAN &

LIU, 2019). O resveratrol possui um grande potencial terapêutico por conta de suas propriedades antimicrobianas, antivirais, anti-inflamatórias, antioxidantes, anti-câncer, anti-envelhecimento, pró-metabólicas, neuro- e cardioprotetoras, sendo também muito utilizado na cosmetologia e dermatologia (RATZ-ŁYKO & ARCT, 2018; GALINIAK *et al.*, 2019). Em relação aos coronavírus, estudos demonstraram a atividade antiviral *in vitro* do estilbeno e seus derivados contra MERS-CoV e SARS-CoV, os quais suprimiram a replicação viral e diminuíram a morte celular induzida pela infecção do agente (LI *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2017; FILARDO *et al.*, 2020). Já Yang *et al.* (2020) e Pasquereau *et al.* (2021), verificaram que o composto inibe a replicação de SARS-CoV-2 em células Vero através de ensaios *in vitro*. Além disso, alguns autores ressaltam que a utilização do resveratrol deve ser explorada não somente como tratamento à COVID-19, mas também como agente complementar por conta de suas atividades biológicas adjacentes (FILARDO *et al.*, 2020; RAMDANI & BACHARI, 2020).

**Figura 3:** Detalhe da estrutura molecular do resveratrol.



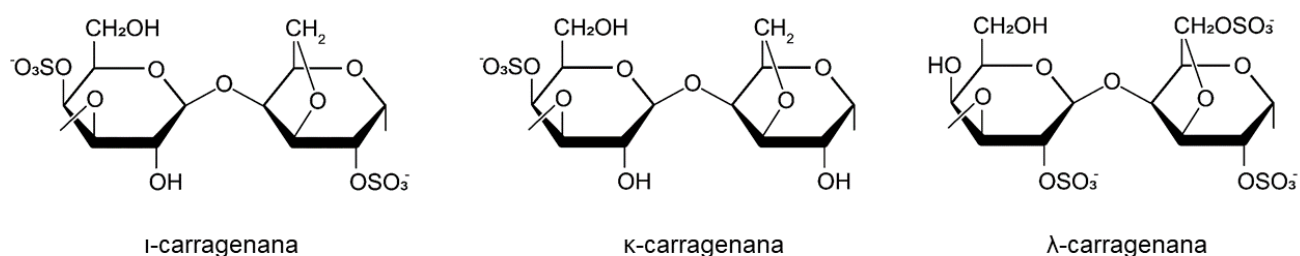
Fonte: A autora.

### 1.3.3 Carragenanas

Por fim, partindo para o grupo dos polímeros, as carragenanas são polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marinhas vermelhas, comumente encontradas nos gêneros *Chondrus*, *Eucheuma*, *Gigartina*, *Kappaphycus* e *Hypnea* (LI *et al.*, 2014). Classificadas de acordo com a estrutura química, são majoritariamente comercializadas nas formas iota ( $\iota$ ), kappa ( $\kappa$ ) e lambda ( $\lambda$ ) (BANSAL *et al.*, 2021). As carragenanas são compostos hidrossolúveis e insolúveis em solventes orgânicos. A solubilidade em meio aquoso é função do tipo ( $\iota$ ,  $\kappa$  e  $\lambda$ ), pH, temperatura, quantidade de contra-íons e demais solutos, por exemplo (CUNHA & GRENHA, 2016). Dentre as atividades biológicas, esses polissacarídeos apresentam

propriedades anticoagulantes, imunomoduladoras, antioxidantes, antitumorais e potentes atividades antivirais, além de possuírem aplicações nas indústrias alimentícias e farmacêuticas como espessantes e estabilizantes (PANGESTUTI & KIM, 2014; BANSAL *et al.*, 2021). Em relação ao coronavírus, análises *in silico* indicam que as carragenanas podem atuar como ligantes para a protease M<sup>pro</sup> presente no SARS-CoV-2, a qual é alvo constante de pesquisas que buscam o desenvolvimento de fármacos (NAIDOO *et al.*, 2020). Por sua vez, estudos *in vitro* demonstram que carragenanas inibem a infecção de SARS-CoV-2 agindo sob a adsorção e internalização viral (BANSAL *et al.*, 2021; FREDIANSYAH, 2021; MOROKUTTI-KURZ *et al.*, 2021; SCHÜTZ *et al.*, 2021; BOVARD *et al.*, 2022). Fröba *et al.*, (2021) demonstraram que ι-carragenana inibe a replicação *in vitro* do SARS-CoV-2, originalmente emergido em Wuhan, além das cepas variantes Alpha, Beta, Gamma e Delta. Já Jang *et al.* (2021) observaram que λ-carragenana inibe a infecção de SARS-CoV-2 *in vivo*. Além disso, a administração de ι-carragenana por via nasal como forma de prevenção e tratamento adjacente de COVID-19 também é considerada, uma vez que o composto já é utilizado em medicamentos para gripe comum causada por influenza (PEREIRA & CRITCHLEY, 2020; FREDIANSYAH, 2021).

**Figura 4:** Detalhes das estruturas químicas das moléculas de ι-, κ- e λ-carragenana.



Fonte: A autora.

As atividades antivirais e virucidas dos compostos bioativos quercetina, resveratrol, curcumina e carragenanas ilustram o grande potencial de aplicação destas moléculas no combate ao SARS-CoV-2, não somente sob forma de fármacos, mas também como componentes em formulações de uso tópico. Perante a necessidade de alternativas à substituição dos produtos antissépticos para as mãos de uso corrente por formulações contendo ativos naturais, tais compostos são muito promissores. Porém, a prática possui algumas limitações. A baixa biodisponibilidade, o alto peso molecular e a pouca absorção pelo organismo são características que podem resultar na ineficiência dos produtos, uma vez que um dos aspectos cruciais à administração eficaz é a presença de ativos em concentrações suficientes para atingir

e interferir nos alvos biológicos de interesse (RUSSO *et al.*, 2020; WILLIAMSON & KERIMI, 2020). Essas limitações estão diretamente relacionadas à baixa solubilidade aquosa e à sensibilidade a certos fatores físico-químicos dos ativos lipossolúveis, o que pode resultar até mesmo na inativação dos produtos durante seu processamento (ANAND *et al.*, 2007; CAI *et al.*, 2013; GALINIAK *et al.*, 2019; BAMIDELE & EMMAMBUX., 2020; FILARDO *et al.*, 2020).

#### **1.4 Nanotecnologia, compostos bioativos e o combate à COVID-19**

Perante as limitações apresentadas pelo uso de bioativos naturais em formulações antissépticas, as soluções inovadoras da nanotecnologia possibilitam uma melhora na qualidade dos produtos em diversos aspectos. Considerada uma das abordagens mais promissoras do século, a nanotecnologia baseia-se na manipulação e desenvolvimento de materiais em escala nanométrica, englobando faixas em torno de 1 a 100 nanômetros (GOUR & JAIN, 2019; BAYDA *et al.*, 2020). Na área da saúde, as práticas da nanotecnologia são comumente associadas aos sistemas de entrega de fármacos, os quais são conhecidos por sua alta eficácia e especificidade, sendo uma das apostas para o tratamento de doenças como câncer (JAHANGIRIAN *et al.*, 2017).

O processo de encapsulamento de compostos é baseado no revestimento dos agentes bioativos por outras substâncias, os quais, quando combinados, resultam na formação de arranjos moleculares em escalas micro ou nanométricas (BAMIDELE & EMMAMBUX, 2020). Dentre os sistemas de distribuição empregados para aumentar a performance dos compostos bioativos, a redução de tamanho e forma de partículas é muito vantajosa, comparativamente a outros métodos (BAMIDELE & EMMAMBUX, 2020). Através da nanoestruturação é possível obter um aumento nas propriedades físico-químicas dos ativos, tais como solubilidade, estabilidade, biodisponibilidade e absorção, possibilitando, também, um controle da liberação destes nos sistemas biológicos, e.g., biofluidos, tecidos, células (CHUNG *et al.*, 2019; JONES *et al.*, 2019). Diversos fatores intrínsecos influenciam na performance biológica dos compostos bioativos, como por exemplo o tamanho, estrutura espacial das moléculas, polaridade, sensibilidade à luz, pH e temperatura, os quais podem ser minimizados ou estabilizados quando em sistemas nanométricos, aumentando assim o valor terapêutico e as possibilidades de aplicações dos agentes (RATZ-ŁYKO & ARCT, 2018; TIAN & LIU, 2019).

Neste cenário, diferentes sistemas nanoderivados de distribuição de compostos bioativos podem ser empregados, em associação com o interesse e finalidade dos produtos. De

acordo com Yetisgin et al. (2020), os nanomateriais comumente utilizados na terapêutica podem ser classificados em três tipos principais: lipídicos, poliméricos e não poliméricos, além dos diferentes sistemas estruturais empregados em cada um destes (Quadro 1).

**Quadro 1:** Classificação dos nanomateriais comumente utilizados para fins terapêuticos.

<b>Nanomateriais</b>	<b>Tipos de estruturas</b>
<b>Poliméricos</b>	Nanopartículas
	Micelas
	Nanogéis
	Nanopartículas proteicas
	Fármacos conjugados
	Dendrímeros
<b>Não poliméricos</b>	Nanodiamantes
	<i>Quantum dots</i>
	Nanopartículas metálicas
	Nanopartículas de sílica
	Nanotubos de carbono
<b>Lipídicos</b>	Lipossomas
	Exossomas
	Nanopartículas lipídicas sólidas

**Fonte:** Adaptado de Yetisgin et al. (2020).

Perante a ampla diversidade química apresentada pelos compostos bioativos e as diferentes estruturações proporcionadas pelas práticas da nanotecnologia, considera-se esta uma área de possibilidades ilimitadas (BUNT, 2018). Além disso, a redução dos impactos ambientais também é um dos apelos a ser mencionado, uma vez que o desenvolvimento de sistemas nanocarreadores de compostos farmacologicamente relevantes pode ser baseado em matrizes provenientes de fontes naturais, como polímeros, proteínas ou lipídios. Além disso, o seu processamento também pode envolver o uso de técnicas sustentáveis, como, por exemplo, a utilização de materiais e fonte de energia renováveis, reações de maior eficiência, menor geração de resíduos e uso de reagentes de baixa ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao ambiente (JAHANGIRIAN *et al.*, 2017).



Já em relação à pandemia da COVID-19, a abordagem nanotecnológica possui aplicações em diversos ramos, desde a prevenção até o diagnóstico e tratamento, uma vez que os nanomateriais podem atuar em sistemas carreadores de fármacos, métodos de detecção e desenvolvimento de vacinas (RAI *et al.*, 2021). Tratamentos à base de nanoderivados já são comercializados e utilizados no combate de outras infecções virais, como IAV, IBV, EBOV, HSV1, HCV e HBV (YANG, 2021). No que diz respeito aos coronavírus, algumas semelhanças entre SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2, bem como as ferramentas utilizadas no manejo destes agentes, têm sido apontadas como indicadores para o desenvolvimento de estratégias de combate (PALESTINO *et al.*, 2020). Dentre as principais abordagens anti-COVID-19 desenvolvidas pela nanotecnologia destacam-se: *i)* o uso de nanomateriais com atividade virucida no revestimento de equipamentos e objetos, como a máscara facial; *ii)* formulação de produtos antissépticos e/ou desinfetantes de uso pessoal e coletivo; *iii)* utilização de nanossensores em kits e métodos diagnósticos para detecção viral rápida, eficaz e de baixo custo; *iv)* desenvolvimento de plataformas vacinais e/ou imunomoduladoras; e *v)* sistemas carreadores de fármacos para entrega controlada e direcionada nos tecidos-alvos (PALESTINO *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 2021).

Estudos clínicos com a administração de curcumina nanoestruturada têm evidenciado os efeitos benéficos do composto no tratamento da COVID-19. Valizadeh *et al.* (2020) demonstraram que nanomicelas do ativo modulam o mRNA e a secreção das citocinas pró-inflamatória IL-1 $\beta$  e IL-6, regulando a resposta inflamatória de pacientes portadores daquela patologia. Hassaniazad *et al.* (2021) também observaram a atividade imunomoduladora da nano-curcumina, a qual diminui as respostas dos linfócitos Th1 e Th17, aumenta a regulação das células T, reduz as citocinas pró-inflamatórias IL-17 e IFN- $\gamma$  e aumenta a secreção das citocinas supressoras TGF- $\beta$  e IL-4, facilitando, assim, o processo de recuperação da resposta inflamatória exacerbada desencadeada pela COVID-19. Já Ahmadi *et al.* (2021) verificaram que a administração diária de nanoformulações contendo curcumina pode aliviar sintomas como tosse, calafrios, perda de olfato e paladar característicos da doença. Resultados semelhantes foram constatados por Saber-Moghaddam *et al.* (2020), os quais verificaram que o tratamento melhora os níveis de oxigenação e reduz o tempo de internação hospitalar dos pacientes.

Em relação aos demais compostos bioativos listados (quercetina, resveratrol e carragenanas), até o momento da escrita deste trabalho não foram encontrados estudos com nanoformulações que avaliem o efeito dos ativos contra o SARS-CoV-2. Portanto, aumentar as pesquisas sobre as potenciais aplicações da nanotecnologia em associação aos bioativos

naturais e suas atividades anti-coronavírus é de extrema importância, dadas às amplas propriedades apresentadas por estes agentes.

## **2. HIPÓTESE DE PESQUISA**

Devido à ampla gama de atividade antiviral apresentada pelos compostos bioativos selecionados para o desenvolvimento desta pesquisa, a hipótese é de que a associação destes ativos em uma formulação nanoestruturada resultará na criação de um antisséptico de alta eficácia contra o SARS-CoV-2.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver uma nanoemulsão antisséptica à base de compostos bioativos naturais, visando a atividade virucida contra o SARS-CoV-2.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver nanoemulsões contendo compostos bioativos naturais e caracterizá-las quanto ao tamanho das nanopartículas, índice de polidispersão e potencial zeta;
- Avaliar a estabilidade física das formulações quanto aos efeitos da temperatura e do tempo de armazenamento;
- Avaliar as formulações selecionadas quanto à ação antisséptica através de análises microbiológicas de Concentração Inibitória Mínima (do inglês, *Minimum Inhibitory Concentration* - MIC) para espécie alvo.
- Avaliar a atividade anti-SARS-CoV-2, em modelo celular *in vitro*, das nanoformulações produzidas.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material**

Quercetina diitradata foi adquirida na empresa Galena Química e Farmacêutica Ltda. (Campinas - SP, Brasil). Curcumina foi adquirida na empresa Active Pharmaceutica (Palhoça - SC, Brasil). Resveratrol foi adquirido junto à Purifarma Distribuidora Química e Farmacêutica (Anápolis - GO, Brasil). Polietilenoglicol 400 foi comprado da Saber Química (Barueri - SP, Brasil), enquanto polisorbato 80 e ácido cáprico foram provenientes da Alpha Química<sup>®</sup> (Porto Alegre - RS, Brasil). Óleo essencial de melaleuca foi adquirido da empresa Vegetal Brasil<sup>®</sup> (Palhoça - SC, Brasil) e o oleato de sorbitan junto à Volp Indústria e Comércio (Osasco - SP, Brasil). Ácido oleico foi proveniente da A. Azevedo Indústria e Comércio de Óleos Ltda. (São Paulo - SP, Brasil) e o óleo de linhaça foi adquirido da Distriol Indústria e Comércio Ltda. (Bom Jesus dos Perdões - SP, Brasil). Por fim, as carragenanas iota-, lambda- e kappa foram adquiridas da CPKelco Brasil (Limeira - SP, Brasil). A água purificada utilizada nos ensaios gerada em equipamento de osmose reversa Evolution RO0520 (Permutation<sup>®</sup> - Curitiba - PR, Brasil).

### **4.2 Estudo das formulações**

#### **4.2.1 Triagem de compostos bioativos e testes de solubilidade**

A pesquisa foi iniciada partindo de relatos prévios na literatura de compostos com eventual atividade antiviral, a saber: curcumina, resveratrol, quercetina, carragenanas e óleo essencial de melaleuca. Inicialmente, estes ativos foram avaliados quanto à atividade antiviral e solubilidade com base nos relatos da literatura. Tal análise objetivou determinar os componentes da formulação. O Quadro 2 indica resumidamente as propriedades de interesse dos compostos em estudo.

**Quadro 2:** Atividade antiviral e solubilidade dos compostos bioativos candidatos.

<b>Composto</b>	<b>Atividade antiviral</b>	<b>Solubilidade</b>	<b>Referências</b>
Curcumina	SARS-CoV, HSV, RSV, influenza, CHIKV, HIV, HPV, DENV.	Baixa solubilidade em água; Solúvel em álcool, DMSO e óleo.	ADITYA <i>et al.</i> , 2017; BOLLIMPELLI <i>et al.</i> , 2016; GUZMAN-VILLANUEVA <i>et al.</i> , 2013; VECCHIONE <i>et al.</i> , 2016; ZAHEDIPOUR <i>et al.</i> , 2020.
Resveratrol	MERS-CoV, SARS-CoV, RSV, HCoV, HRV, influenza.	Insolúvel em água; Baixa solubilidade em óleo; Solúvel em álcool, Tween 80 e PEG 400.	BALATA <i>et al.</i> , 2016; FILARDO <i>et al.</i> , 2020; LIN <i>et al.</i> , 2017; PUJARA <i>et al.</i> , 2017; ROBINSON <i>et al.</i> , 2015; SALEM <i>et al.</i> , 2019.
Quercetina	SARS-CoV, HRV, CMV, DENV-2, HSV-1, RSV, parainfluenza-3.	Baixa solubilidade em água e óleo; Solúvel em álcool, PEG 400, e DMSO.	BAKSI <i>et al.</i> , 2018; BIANCATELLI <i>et al.</i> , 2020; OLIVER <i>et al.</i> , 2018; WANG <i>et al.</i> , 2016.
Carragenanas	HSV-1, HSV-2, HPV, DENV, H1N1, HRV, VV, CMV.	Solúvel em água.	GRICE & MARIOTTINI, 2018; JAISWAL <i>et al.</i> , 2019.
Óleo essencial de melaleuca	H1N1.	Não se aplica.	LI <i>et al.</i> , 2013.

Num segundo momento, a fim de determinar o solvente mais adequado à solubilização dos ativos (Quadro 2), soluções foram preparadas adicionando quantidades definidas dos compostos bioativos em óleo de linhaça, ácido cáprico, ácido oleico e polietilenoglicol 400 (PEG 400). Assim, as soluções foram preparadas a partir de 0,1 g de cada composto bioativo em 10 g de solvente, sob agitação magnética por cerca de 10 min. Ao todo, este ensaio resultou no preparo de 12 soluções, conforme descrito na Tabela 1, que ilustra esquematicamente a constituição de cada solução.

**Tabela 1:** Composição das soluções aos ensaios de solubilidade.

<b>Soluções</b>	
<b>Composto bioativo</b>	<b>Solvente</b>
0,1 g de quercetina	10 g de óleo de linhaça
	10 g de ácido cáprico
	10 g de ácido oleico
	10 g de PEG 400
0,1 g de resveratrol	10 g de óleo de linhaça
	10 g de ácido cáprico
	10 g de ácido oleico
	10 g de PEG 400
0,1 g de curcumina	10 g de óleo de linhaça
	10 g de ácido cáprico
	10 g de ácido oleico
	10 g de PEG 400

Estes ensaios foram realizados apenas com curcumina, resveratrol e quercetina, uma vez que as carragenanas são solubilizadas em água e o óleo essencial de melaleuca não necessita de solubilização prévia. Destaca-se que durante todo o processo de desenvolvimento das formulações não foram utilizados solventes orgânicos devido aos reconhecidos impactos ambientais e sanitários destes (CHEMAT *et al.*, 2019), i.e., tipicamente uma abordagem de desenvolvimento associada à química verde. Nesta etapa, ao final dos ensaios um dos três compostos bioativos testados foi selecionado para compor a formulação, juntamente com o solvente que melhor o solubilizou.

#### **4.2.2 Preparo das nanoemulsões**

Emulsões do tipo óleo em água (O/A) foram preparadas de acordo com os seguintes parâmetros: A fase oleosa foi composta por óleo essencial de melaleuca (20%, v/v), polisorbato 80 (Tween 80), oleato de sorbitan (Span 80), o composto bioativo e o solvente escolhido, enquanto a fase aquosa foi composta apenas por água purificada em quantidade suficiente para

o volume final de 100 mL. De modo a determinar a formulação mais adequada aos propósitos da investigação, foi realizado um estudo sistemático com as formulações, as quais contiveram diversas concentrações de Tween 80 (2% e 4%), Span 80 (0%, 1% e 2%), composto bioativo (0,1%, 0,25% e 0,5%) e solvente escolhidos (5% e 10%). O grupo controle foi composto por formulações sem o ativo.

Em relação ao preparo das emulsões, a fase oleosa foi dispersa na fase aquosa sob agitação magnética em tempo suficiente para que resultasse em uma mistura homogênea. Ao todo, 32 formulações foram preparadas, sendo a composição final de cada uma indicada na Tabela 2.

**Tabela 2:** Composição das emulsões (% m/v).

Formulação	Óleo essencial de melaleuca	Tween 80	Span 80	Ativo escolhido	Solvente	Água
T1		2			5	73
T2		2	-		10	68
T3		4			5	71
T4		4			10	66
T5		2	1		5	72
T6	20	2	1	-	10	67
T7		4	2		5	69
T8		4	2		10	64
T9		2			5	72,9
T10		2			10	67,9
T11		4	-		5	70,9
T12	20	4		0,1	10	65,9
T13		2	1		5	71,9
T14		2	1		10	66,9
T15		4	2		5	68,9
T16		4	2		10	63,9
T17		2			5	72,75
T18	20	2	-	0,25	10	67,75
T19		4			5	70,75

T20		4		10	65,75
T21		2	1	5	71,75
T22		2	1	10	66,75
T23		4	2	5	68,75
T24		4	2	10	63,75
T25		2		5	72,5
T26		2		10	67,5
T27		4	-	5	70,5
T28		4		10	65,5
T29	20	2	1	5	71,5
T30		2	1	10	66,5
T31		4	2	5	68,5
T32		4	2	10	63,5

**Legenda:** (-) ausência de span 80 e/ou ativo na formulação.

Após o término da preparação, cada emulsão foi submetida à escala nanométrica através da passagem por homogeneizador de alta pressão (Homolab 2.50 - FBF, Parma, Itália), sob condições de 500±51 bar, em três ciclos de processamento de 1 min, totalizando 3 min no total.

#### 4.2.3 Caracterização físico-química das nanoemulsões

As nanoemulsões foram caracterizadas quanto ao tamanho médio das nanopartículas e índice de polidispersão (PdI) por espalhamento de luz dinâmico em ângulo de 90°, enquanto o potencial zeta foi determinado por microeletroforese Doppler a laser, sendo ambas as medições realizadas em equipamento Zetaziser Nano ZS (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). As amostras foram diluídas com água purificada (1: 10), sendo realizados ajustes quando necessário.

#### 4.2.4 Estudo de estabilidade acelerada e estresse térmico

A estabilidade das nanoemulsões foi avaliada por espalhamento múltiplo de luz através do equipamento LUMiSizer (LUM GmbH, Berlim, Alemanha). Nesta análise, as amostras são

submetidas à centrifugação e, durante o processo, varreduras em intervalos de tempo determinados são realizadas para verificação da estabilidade física das formulações. Assim, é possível obter informações a respeito do tempo de vida de prateleira do produto. Os parâmetros utilizados na medição para simulação de 8 meses foram: número de perfis = 255, velocidade = 4000 rpm, intervalo entre as medidas = 34, fator de luz = 1, temperatura 25 °C, tempo total = 2,41 h.

A estabilidade física também foi avaliada em relação aos efeitos da temperatura. Neste caso, as nanoemulsões (10 mL) foram acondicionadas em tubos Falcon e armazenadas à 30°C e 40°C, por cerca de 3 meses. Os efeitos da temperatura na estabilidade das formulações foram constatados visualmente.

#### **4.2.5 Incorporação de carragenana**

A partir dos resultados das análises anteriores, uma formulação foi escolhida para a incorporação de carragenana em sua composição. A formulação foi preparada novamente e a incorporação do polissacarídeo ocorreu por meio da fase aquosa, a qual era composta por carragenana e água purificada. Três tipos de carragenanas foram testadas ( $\kappa$ -,  $\lambda$ - e  $\iota$ -carragenana) e concentrações variáveis dos polissacarídeos foram incorporadas para verificar seus efeitos no sistema. Após o preparo, as emulsões foram transferidas a homogeneizador de alta pressão e caracterizadas quanto ao tamanho médio das nanopartículas, índice de polidispersão e potencial zeta, sob as mesmas condições descritas nos itens 4.2.2 e 4.2.3. Ao final, uma das três carragenanas testadas foi escolhida para compor a formulação.

#### **4.2.6 Estudo paramétrico da estabilidade físico-química**

Após a incorporação de carragenana, a estabilidade das formulações de interesse foi avaliada em relação aos efeitos da temperatura através de um estudo paramétrico. As nanoemulsões foram acondicionadas em embalagens plásticas (10 mL cada) e incubadas à 25°C, 30°C e 40°C, por 3 meses. Durante este período, as características físico-químicas foram monitoradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos (7 dias, 15 dias, 30 dias, 60 dias e 90 dias), sendo determinados o tamanho médio das nanopartículas, índice de polidispersão e potencial zeta, sob as mesmas condições descritas no item 4.2.3 e o pH do sistema.



### 4.3 Avaliação da eficácia e ensaios *in vitro*

#### 4.3.1 Teste de MIC

As formulações escolhidas foram submetidas a testes de determinação da MIC para a espécie bacteriana *Staphylococcus aureus*, conforme especificações da ANVISA para produtos desinfetantes (ANVISA, RDC 14/2007). Os ensaios foram realizados seguindo as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003), empregando a técnica de microdiluição em caldo Mueller-Hinton. Foram testadas oito concentrações das formulações (0,08%, 0,15%, 0,31%, 0,63%, 1,25%, 2,5%, 5% e 10%), com cinco réplicas cada uma. A MIC foi determinada através da adição do revelador resazurina e o resultado constatado visualmente.

#### 4.3.2 Ensaio de citotoxicidade e atividade contra o SARS-CoV-2

Os ensaios de atividade contra o SARS-CoV-2 foram realizados em colaboração com a Dra. Milene Dias Miranda, do Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral (LMMV) do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz, RJ.

**Cultivo Celular** – Células de linhagem Vero E6 (rim de macaco verde africano) foram cultivadas em meio com alta glicose - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; GIBCO) - suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao atingir a confluência, as células foram cultivadas em placas de 96 poços com densidade de  $1,5 \times 10^4$  células/poço, por 24h, conforme protocolo padrão (LEAL *et al.*, 2021).

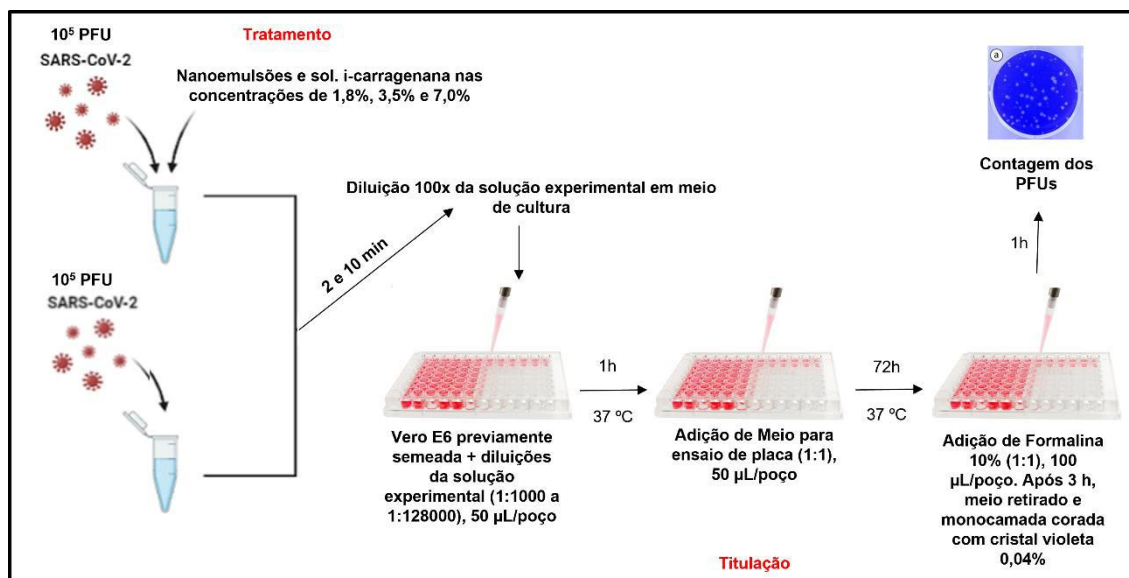
**Vírus** – Todos os procedimentos para crescimento viral e os experimentos *in vitro* foram realizados em laboratório com nível de biossegurança 3 (NB3) da Fundação Oswaldo Cruz (RJ), de acordo com as recomendações da OMS (WHOg, 2021). Os isolados de SARS-CoV-2 (GenBank MT710714, SisGen AC58AE2) permaneceram armazenados em freezer (-80°C) até o momento de manipulação.

**Ensaio de citotoxicidade** – Em uma placa de 96 poços, células Vero ( $1,5 \times 10^4$  célula/poço) foram tratadas com as nanoformulações FA e FB, bem como com uma solução contendo 0,6% de ι-carragenana livre para fins comparativos. Para tal, os produtos foram

diluídos a 1,8%, 3,5% e 7,0% em meio de cultura. Posteriormente, a solução resultante foi diluída 1000x para então ser adicionada à cultura celular. Após 72h de exposição, a viabilidade foi determinada por coloração com azul de metileno de modo a quantificar o percentual de células viáveis pós-tratamento. Para essa análise, as células foram lavadas com solução salina e fixadas/coradas por 1h em estufa com solução de azul de metileno (Solução de Hanks (HBSS) + 1,25% glutaraldeído + 0,6% azul de metileno). Em seguida, realizou-se a remoção, lavagem do material com água destilada e sua secagem em temperatura ambiente. Subsequentemente, foi adicionada a solução de eluição contendo 50% de etanol + 49% de PBS + 1% de ácido acético e as células foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Por fim, o sobrenadante das culturas coradas foi transferido para uma placa de 96 poços e realizou-se a leitura da absorbância em comprimento de onda de 660 nm. As células expostas apenas ao meio de cultura, sem nenhum tratamento, foram consideradas como 100% da viabilidade (grupo controle). Já as células tratadas com diferentes porcentagens dos produtos tiveram sua viabilidade comparada ao grupo controle.

**Ensaio antiviral (virucida) e titulação viral** – Para avaliação da atividade virucida dos produtos,  $10^5$  PFU do vírus SARS-CoV-2 foram expostos ou não aos compostos FA, FB e solução com 0,6% de  $\iota$ -carragenana em meio de cultura (controle para o tratamento), todos nas concentrações de 1,8%, 3,5% e 7,0%, durante 2 e 10 minutos. Após esses períodos, a solução experimental foi diluída 100x, e adicionada às culturas de células previamente semeadas em placas de 96 poços para titulação viral nas proporções 1:1000 a 1:128000 (8 diluições seriadas de base 2). Após 1h de infecção, foi adicionado na mesma proporção o meio para ensaio de placa (DMEM 10x, bicarbonato de sódio a 0,22%, 2% de SFB, penicilina e estreptomicina a 1% e carboximetilcelulose a 2,4%) e a infecção foi mantida em estufa por 72h. Passado o tempo de infecção, adicionou-se o mesmo volume de formalina 10% para fixação das células e inativação viral. Após o período de 3h, o meio foi removido e a monocamada corada por 1h com cristal violeta a 0,04%. Por fim, foi realizada a remoção do corante, lavagem das placas em água corrente e secagem do material à temperatura ambiente para posterior quantificação das unidades formadoras de placas (PFUs). Neste ensaio, foi avaliado se a exposição do vírus aos produtos promove a redução da infectividade viral, ou seja, se há atividade virucida (redução ou eliminação da capacidade replicativa viral em modelo celular). O resumo desta metodologia encontra-se no esquema 1.

**Esquema 1:** Etapas do ensaio para avaliação do efeito virucida dos produtos sobre o vírus SARS-CoV-2.



#### 4.4 Análises estatísticas

Os dados adquiridos ao longo do desenvolvimento deste projeto foram coletados, sumarizados e avaliados quanto à homocedasticidade (teste de Bartlett) e normalidade (teste de Shapiro Wilk). O conjunto de dados das variáveis em estudo foi analisado por técnicas estatísticas univariadas, a saber: análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de significância, com auxílio dos programas Microsoft Office Excel (Redmond, Washington, EUA) e GraphPad Prism 7 (San Diego, Califórnia, EUA). Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. Já os dados referentes aos ensaios de citotoxicidade e atividade virucida foram analisados por ANOVA seguida por teste de Dunnett's e Two-way ANOVA seguida por teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95% e valores de  $p \leq 0,001$  significativos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo das formulações

#### 5.1.1 Triagem de compostos bioativos, testes de solubilidade e preparo das nanoemulsões

A triagem dos compostos bioativos de interesse, bem como os testes de solubilidade, resultaram no preparo de quatro soluções para cada ativo - curcumina, resveratrol e quercetina – com variações somente em relação ao solvente testado. As figuras 5, 6 e 7 revelam o aspecto visual da solubilidade de cada composto e seu respectivo solvente.

**Figura 5:** Solubilização da curcumina nos solventes avaliados (PEG, óleo de linhaça, ácido oléico e ácido cáprico).



**Figura 6:** Solubilização do resveratrol nos solventes avaliados (PEG, óleo de linhaça, ácido oléico e ácido cáprico).



**Figura 7:** Solubilização da quercetina nos solventes avaliados (PEG, óleo de linhaça, ácido oléico e ácido cáprico).



Como pode ser constatado visualmente, o PEG 400 foi o solvente que melhor solubilizou todos os três bioativos em comparação aos demais, o que resultou na sua escolha para compor as formulações. O PEG 400 é um polímero comumente utilizado pela indústria farmacêutica devido a sua baixa toxicidade, boa compatibilidade cutânea, não ser metabolizado e também por ser facilmente miscível em sistemas aquosos e solventes orgânicos (ABDELBARY *et al.*, 2019; FERRARI *et al.*, 2020). Além disso, apresenta propriedades de alto interesse para a indústria, como reciclabilidade, degradabilidade, baixa inflamabilidade e atoxicidade, o que reduz os impactos ambientais de seu uso em processos industriais, comparativamente aos solventes orgânicos (MARYAMABADI *et al.*, 2016).

Em relação à solubilização de compostos bioativos em sistemas nanotecnológicos, diversos autores têm demonstrado a aplicabilidade daquele solvente. Castangia *et al.* (2014) formularam nanovesículas de quercetina e curcumina, solubilizadas em PEG400, para uso tópico à inibição de lesões cutâneas em modelo *in vivo*. Os autores verificaram que os nanossistemas foram efetivos ao evitar os danos e relacionaram este efeito à maior biodisponibilidade dos ativos no tecido alvo, o que é promovido tanto pela nanoestruturação dos sistemas quanto pela solubilização dos compostos em PEG400, uma vez que este facilita a passagem dos ativos pela barreira do estrato córneo. Resultados semelhantes foram constatados por Caddeo *et al.* (2013) em nanovesículas de quercetina com a mesma finalidade. Já Rachmawati *et al.* (2014) verificaram que a associação de curcumina com PEG 400 em nanoemulsão de uso tópico promove a estabilidade físico-química do sistema e aumenta a permeabilidade do ativo na pele. Estudos com outros flavonoides de uso tópico, como a apigenina e crisina, também ressaltam a eficiência daquele solvente, com aumento da biodisponibilidade e segurança de uso dos ativos na pele (DYJA & JANKOWSKI, 2017; XU *et al.*, 2021).

Outro fator relevante à escolha do PEG 400 como componente das formulações foi o papel que este desempenha em sistemas emulsionados. O PEG400 aumenta a miscibilidade de compostos hidrofóbicos em sistemas aquosos, reduzindo a tensão interfacial entre a água e os bioativos, fato relacionado à presença de grupos hidrofílicos de ligação de hidrogênio em suas moléculas, os quais interagem com as regiões hidrofóbicas dos hidrocarbonetos (CADDEO *et al.*, 2013). Uma vez que os compostos bioativos avaliados neste estudo são lipofílicos e/ou lipossolúveis, a presença do PEG400 nas nanoemulsões do tipo O/A favorece a solubilidade dos mesmos no sistema (CADDEO *et al.*, 2013). Assim, além do PEG 400 promover a estabilidade do sistema, também aumenta a biodisponibilidade dos compostos bioativos.

Já em relação aos compostos bioativos avaliados, a quercetina foi escolhida para compor as formulações devido a dois aspectos principais: 1) as atividades biológicas do ativo, as quais representam potenciais vantagens para um produto antisséptico e; 2) a facilidade de manipulação do composto em termos de processo produtivo, o que deve ser considerado quando a formulação será adotada em rotina de produção, com escalabilidade adequada. A quercetina apresenta propriedades antimicrobianas contra uma série de microrganismos relevantes à saúde humana. Li *et al.* (2019) demonstraram que o composto possui atividade contra o fungo filamentoso *Aspergillus flavus*, o qual está associado à contaminação de alimentos e produz toxinas nocivas para humanos e animais. Pal & Tripathi (2019) observaram que a quercetina inibe a atividade de carbapenemases produzidas por bactérias gram-negativas resistentes a carbapenêmicos através da redução da hidrólise dos fármacos nos espaços periplasmáticos e efluxos bacterianos. De forma similar, Güran *et al.* (2019) verificaram que o composto apresenta atividade antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), as quais estão associadas a uma série de infecções que desafiam as práticas médicas, apesar da espécie ser um dos componentes da microbiota natural da pele. Assim, por conta de sua ação contra patógenos de relevância clínica, a quercetina apresenta grande potencial como agente antisséptico.

Outras propriedades daquele flavonoide, como anti-inflamatórias e antioxidantes, também possuem aplicações significativas para uso tópico. Tran *et al.* (2019) desenvolveram um revestimento à base de prata e quercetina como material para curativos, o qual, além da atividade antimicrobiana *in vitro*, também reduziu a inflamação e acelerou o processo de cicatrização de feridas em modelo *in vivo*. Resultados semelhantes foram observados por Badhwar *et al.* (2021), investigando a atividade de nanopartículas de prata carregadas com quercetina em matrizes de hidrogel ao tratamento complementar de feridas diabéticas. Os autores constataram que a formulação teve ação antimicrobiana contra *S. aureus* e *Escherichia*



*coli*, além de aumentar o processo de cicatrização *in vivo*. Chittasupho et al. (2022) observaram que a quercetina isolada, ou em combinação com curcuminoides, é uma boa opção à formulações cicatrizantes de pele, uma vez que o composto pode acelerar o processo de migração dos fibroblastos dérmicos, contribuindo à oclusão de feridas. Além disso, os autores verificaram a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

A aplicação da quercetina em formulações antissépticas possibilita não somente a combinação de propriedades biológicas benéficas para a pele, como também a obtenção de produtos à base de ativos provenientes de matrizes naturais. Porém, a prática possui algumas limitações. Uma das características da quercetina é sua baixa solubilidade aquosa, o que impacta diretamente na sua biodisponibilidade, absorção e atividade biológica, reduzindo-as (MANZOR *et al.*, 2021). Neste cenário, a nanoencapsulação do ativo é uma alternativa que proporciona um aumento no índice terapêutico e biodistribuição, melhorando, assim, a entrega do composto na pele e, conseqüentemente, a ação biológica pretendida (CASTANGIA *et al.*, 2014). Partindo desta perspectiva, 32 nanoemulsões do tipo O/A foram desenvolvidas, diferindo em suas concentrações de quercetina (Figura 8), PEG 400 e compostos tensoativos (Tween 80 e Span 80).

**Figura 8:** Aspecto visual de nanoemulsões de quercetina, conforme as concentrações do composto ativo.



Fonte: A autora.

### 5.1.2 Caracterização físico-química das nanoemulsões

A caracterização físico-química das nanoemulsões envolveu a determinação de três variáveis principais: o tamanho das nanopartículas, o PDI, o qual refere-se ao grau de homogeneidade do sistema e o potencial zeta, que mede as interações eletrostáticas entre as nanopartículas. Além disso, a fim avaliar a influência dos demais compostos das formulações nessas características, os dados obtidos foram correlacionados com as concentrações de tensoativos (Tween 80 e Span 80), quercetina e PEG400 investigadas.

#### 5.1.2.1 Tamanho das nanopartículas

Em relação ao tamanho das nanopartículas, a Tabela 3 apresenta os valores médios obtidos de acordo com as concentrações de cada composto. Os dados também são ilustrados nas figuras 9, 10 e 11, as quais exibem o grau de significância entre as médias.

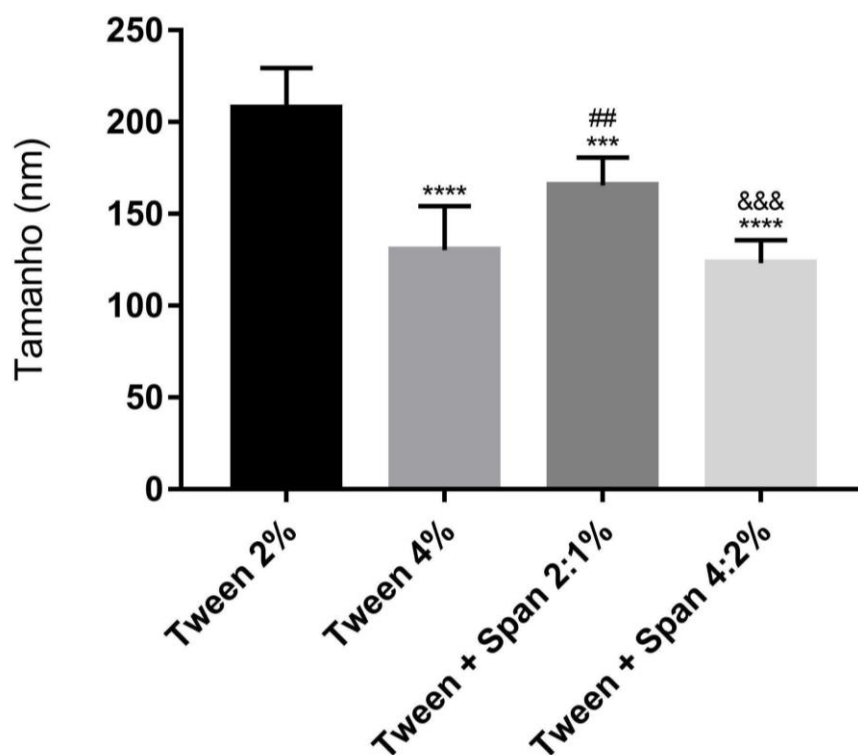
**Tabela 3:** Tamanho das nanopartículas em relação à variação na concentração de tensoativos, quercetina e PEG400.

Compostos	Concentração	Tamanho (nm)
Tween 80	2%	207,7 ± 21,8
	4%	130,3 ± 24,0
Tween 80 + Span 80	2:1%	165,5 ± 15,1
	4:2%	123,1 ± 12,6
Quercetina	0%	154,4 ± 46,8
	0,1%	141,8 ± 34,3
	0,25%	153,8 ± 39,8
	0,5%	176,6 ± 30,0
PEG 400	5%	159,5 ± 38,0
	10%	153,8 ± 40,0

**Legenda:** Valores expressos em média ± desvio padrão da média.

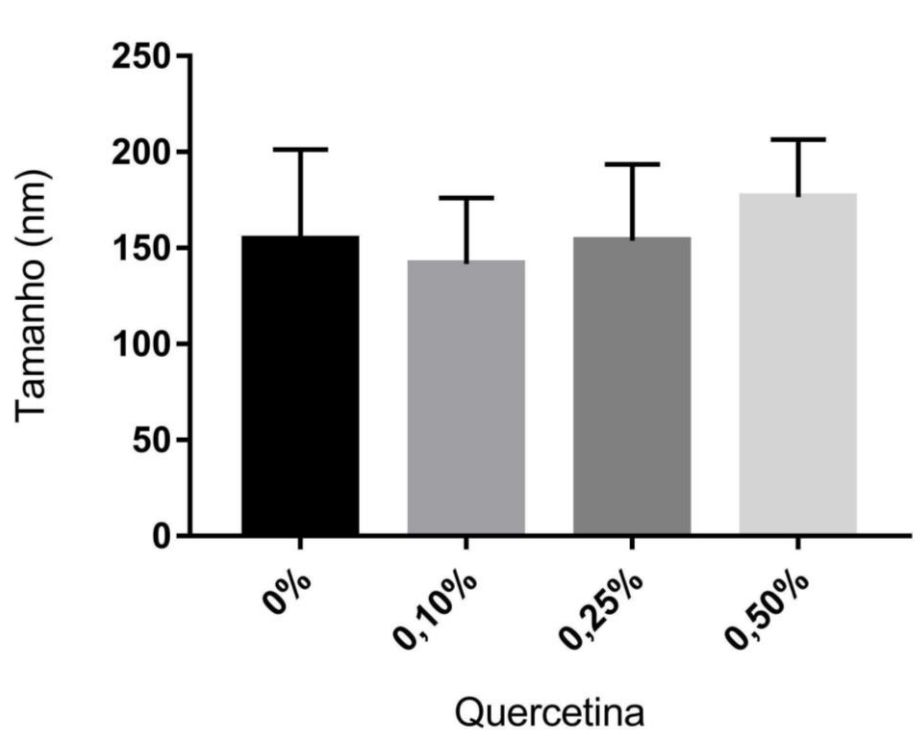


**Figura 9:** Médias de tamanhos das nanopartículas em relação à concentração dos tensoativos Tween e Span.



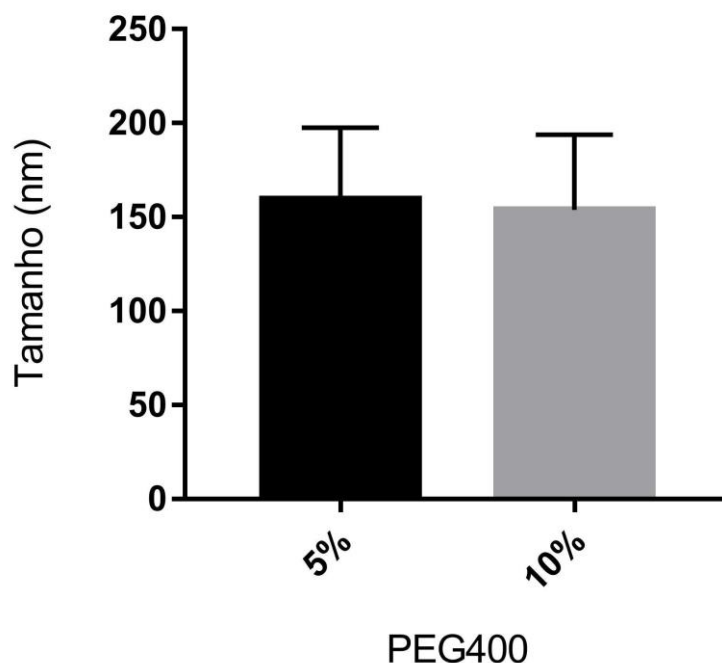
**Legenda:** Os dados são apresentados em médias com marcadores de desvio padrão; ANOVA de uma via, seguida por teste *post-hoc* de Tukey; símbolos distintos representam as diferenças significativas entre as médias, sendo \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  em relação à média de Tween 2%; ##  $p \leq 0,01$  em relação à média de Tween 4% e &&&  $p \leq 0,001$  em relação à média de Tween + Span 2:1%.

**Figura 10:** Médias de tamanhos das nanopartículas em relação à concentração de quercetina.



**Legenda:** Os dados são apresentados em médias com marcadores de desvio padrão; ANOVA de uma via, sendo  $p \geq 0,05$ ; diferenças entre as médias não significativas.

**Figura 11:** Médias de tamanhos das nanopartículas em relação à concentração de PEG400.



**Legenda:** Os dados são apresentados em médias com marcadores de desvio padrão; Teste t não pareado, sendo  $p \geq 0,05$ ; diferenças entre as médias não significativas.

Em geral, o tamanho das nanopartículas situou-se entre 123,1-207,7 nm, com a maior parte das médias permanecendo em torno de 150,0 nm. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos com nanoemulsões à base de quercetina (ARBAIN *et al.*, 2018; GOKHALE *et al.*, 2019; TRAN *et al.*, 2014; VAZ *et al.*, 2020). Os resultados indicam que as diferentes concentrações de quercetina e de PEG400 não são significativas à definição do tamanho das nanopartículas. No entanto, as análises comparativas dentro do grupo dos tensoativos revelaram valores onde a combinação de Tween 80 + Span 80 nas proporções 4: 2% resultaram em sistemas com menor tamanho de nanopartículas. Após, em ordem de significância, está o Tween 80 4%, Tween 80 + Span 80 2: 1% e Tween 80 2%. De modo geral, os sistemas apresentaram nanopartículas entre 100-200 nm, permanecendo dentro dos valores aceitáveis para formulações transdérmicas. Porém, considerando o intuito de uso de partículas de menor tamanho possível, a combinação dos tensoativos na proporção 4: 2% foi determinada como a melhor abordagem para o produto em desenvolvimento.

A caracterização físico-química de formulações nanoestruturadas é imprescindível para garantir a integridade do sistema e as finalidades desejadas. As nanopartículas poliméricas geralmente compreendem diâmetros entre 10-100 nm e, nesta escala, as moléculas e os átomos

se comportam de formas distintas, conferindo aos sistemas inúmeras vantagens em comparação ao uso dos compostos livres (SHANG *et al.*, 2014; JAIN & THAREJA, 2019). Em geral, nanopartículas com diâmetro igual ou maior que 600 nm não são distribuídas e absorvidas adequadamente pelas camadas mais profundas da pele, enquanto aquelas de 300 nm ou menores são capazes de entregar o seu conteúdo até certo nível (DANAEI *et al.*, 2018). Neste cenário, o tamanho das nanopartículas é crucial, pois a medida que as estruturas diminuem, a área de superfície dos ativos no sistema aumenta, impactando diretamente na eficiência, cinética de captação, internalização e biodistribuição dos compostos (SHANG *et al.*, 2014). Uma vez que os apelos da nanotecnologia se baseiam justamente nestes atributos, a obtenção de formulações com tamanho de nanopartículas menores é desejável.

Quanto aos efeitos da concentração de tensoativos no tamanho das nanopartículas, geralmente esses compostos são adicionados aos sistemas para facilitar o processo de emulsificação e aumentar a estabilidade dos mesmos. Em um estudo realizado por Bu *et al.* (2020), os autores avaliaram os efeitos da concentração de Tween 80 no tamanho das gotículas em uma emulsão, os quais apresentaram uma relação inversamente proporcional, ou seja, quanto maior a concentração do tensoativo, menor o tamanho das gotículas de óleo. Esse fenômeno pode ser explicado justamente por se tratarem de compostos que reduzem a tensão interfacial entre as fases aquosas e oleosas de sistemas de emulsões, quebrando as gotículas durante a emulsificação (BU *et al.*, 2020). Resultados semelhantes foram observados por Lefevre *et al.* (2016), os quais observaram a mesma ligação entre a concentração de tensoativos e o tamanho das nanopartículas em nanodispersões à base de quercetina.

Outro aspecto relevante refere-se à combinação de tensoativos que poderá aumentar a eficiência do processo, pois após as primeiras reações, o surfactante de baixo peso molecular age sobre as interfaces montadas inicialmente e promove ainda mais quebras, permitindo que as partículas cubram todas as interfaces óleo/água e reduzam os eventos de coalescência (PICHOT *et al.*, 2010). Assim, a combinação de dois tensoativos não somente propicia a formação de nanopartículas menores, como também impulsiona a estabilização da nanoemulsão.

### **5.1.2.2 PdI**

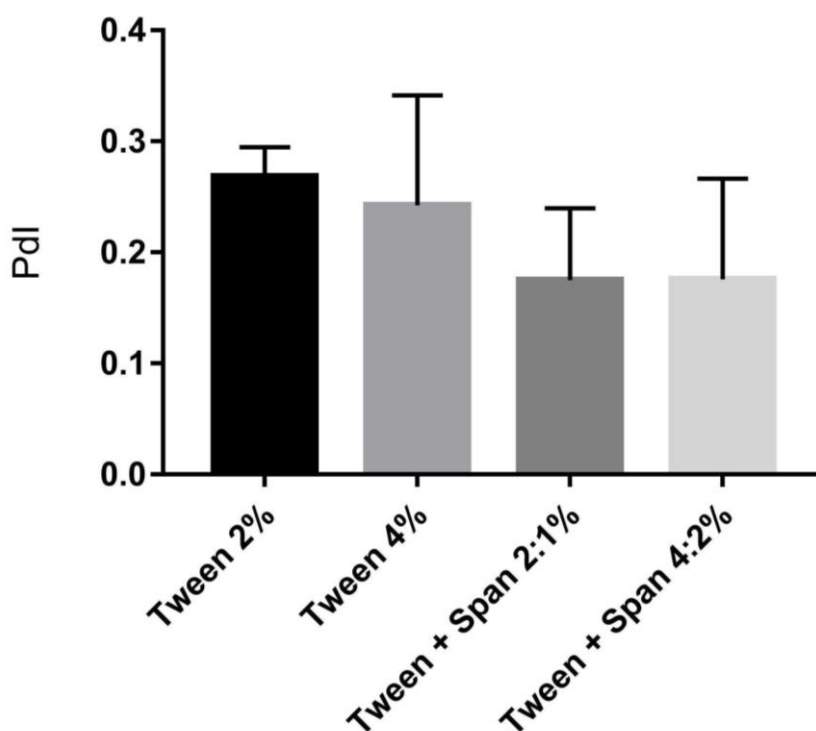
Em relação ao PdI das formulações, a Tabela 4 indica os valores médios obtidos de acordo com as concentrações de cada composto. Os dados também são ilustrados pelas figuras 12, 13 e 14, as quais apresentam o grau de significância entre as médias.

**Tabela 4:** PDI de nanoformulações consoante à concentração de tensoativos, quercetina e PEG400.

Compostos	Concentração	PdI
Tween 80	2%	0,268 ± 0,03
	4%	0,242 ± 0,09
Tween 80 + Span 80	2:1%	0,175 ± 0,06
	4:2%	0,176 ± 0,09
Quercetina	0%	0,185 ± 0,08
	0,1%	0,170 ± 0,06
	0,25%	0,201 ± 0,06
	0,5%	0,305 ± 0,06
PEG 400	5%	0,227 ± 0,08
	10%	0,204 ± 0,08

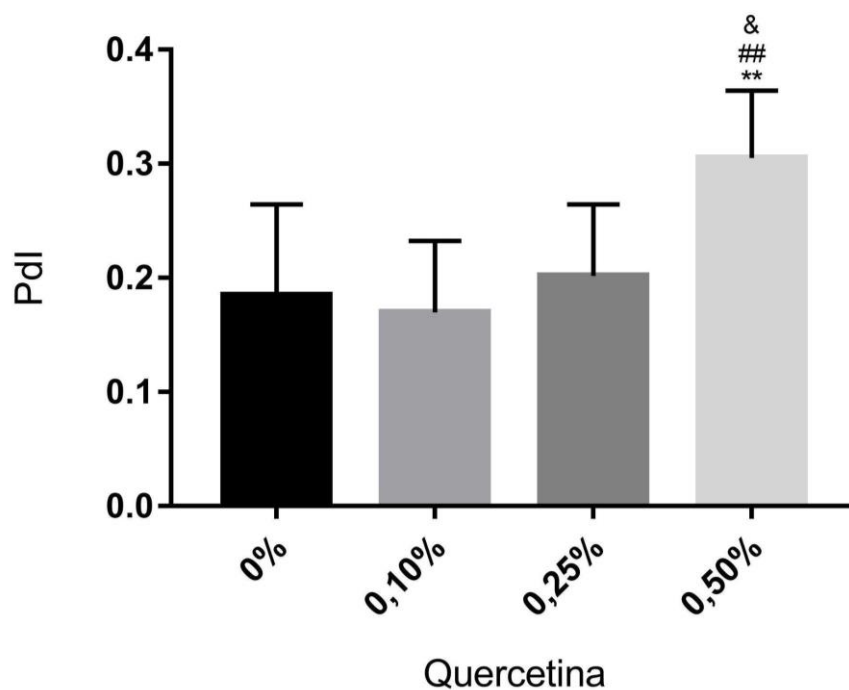
**Legenda:** Valores expressos em média ± desvio padrão da média.

**Figura 12:** Valores médios de PDI das nanoformulações em relação à concentração dos tensoativos Tween e Span.



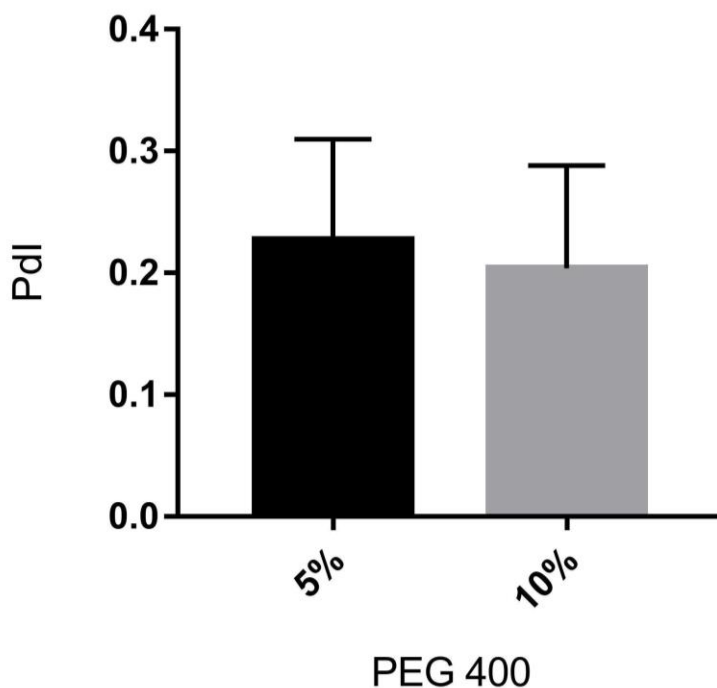
**Legenda:** Dados apresentados como médias e com marcadores de desvio padrão; ANOVA de uma via, sendo  $p \geq 0,05$ ; diferenças entre as médias não significativas.

**Figura 13:** Valores médios de PDI das nanoformulações em relação à concentração de quercetina.



**Legenda:** Os dados são apresentados em médias com marcadores de desvio padrão; ANOVA de uma via, seguida por teste *post-hoc* de Tukey; símbolos distintos representam as diferenças significativas entre as médias, sendo \*\*  $p \leq 0,01$  em relação a 0% de quercetina; ##  $p \leq 0,01$  em relação a 0,1% de quercetina e &  $p \leq 0,05$  em relação a 0,25% de quercetina.

**Figura 14:** Valores médios de PDI das nanoformulações, consoante à concentração de PEG 400.



**Legenda:** Os dados são apresentados em médias com marcadores de desvio padrão; Teste t não pareado, sendo  $p \geq 0,05$ ; diferenças entre as médias não significativas.

Os valores de PDI das nanoformulações distribuíram-se no intervalo de 0,170-0,305, com a maior parte das médias permanecendo em torno de 0,200. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos com nanoemulsões à base de quercetina (ARBAIN *et al.*, 2018; GOKHALE *et al.*, 2019; SON *et al.*, 2019). Em relação aos efeitos dos constituintes da formulação, os dados indicam que as concentrações de PEG 400 não influenciaram significativamente os valores de PDI do sistema. Já no caso dos tensoativos, apesar de não haver diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias, valores menores de PDI nas combinações de Tween 80 + Span 80, em comparação ao uso de Tween 80 isoladamente, foram detectados. Este resultado pode estar relacionado aos efeitos dos surfactantes sobre o tamanho das nanopartículas - conforme descrito no item 5.1.2.1 -, impactando indiretamente na distribuição das mesmas. Quanto à quercetina, as concentrações de 0,1% e 0,25% apresentaram valores aceitáveis de PDI (abaixo de 0,3), enquanto que a nanoformulação contendo 0,5% daquele flavonoide alcançou um limite de PDI significativo, i.e.,  $> 0,3$ .

O PDI é uma variável importante para a segurança e eficácia de sistemas à base de nanocarreadores lipídicos, uma vez que os mesmos apresentam uma tendência de acumulação nos tecidos-alvo (DANAIEI *et al.*, 2018). Este índice refere-se à distribuição do tamanho das

nanopartículas no sistema, classificando-as quanto ao grau de uniformidade através de valores entre 0,0 (uniforme/monodispersão) e 1,0 (alta polidispersão) (DANA EI *et al.*, 2018; FARDOUS *et al.*, 2021). Assim, quanto menor o PDI, mais homogênea é a distribuição das nanopartículas na formulação. Além disso, valores de PDI iguais ou menores que 0,3 são comumente utilizados e aceitos para sistemas com transportadores lipídicos, desempenhando um papel referencial (DANA EI *et al.*, 2018).

No presente estudo, como o sistema nanoestruturado alcançou um valor PDI de 0,3 com 0,5% de quercetina, tem-se nesta concentração o limite possível de utilização daquele flavonoide na formulação. Cabe ressaltar que cada sistema nanoestruturado é único sob certas condições, de modo que a análise das variáveis investigadas no presente estudo permitem conhecer o sistema e suas dinâmicas, incluindo a identificação dos possíveis limites de conteúdos de componentes da formulação. Portanto, os resultados indicam quais as melhores concentrações de quercetina para o produto são 0,1% e 0,25%.

### **5.1.2.3 Potencial Zeta**

A Tabela 5 apresenta os valores médios de potencial zeta das nanoformulações, de acordo com as concentrações de cada composto. Os dados também são ilustrados pelas figuras 15, 16 e 17, as quais exibem o grau de significância entre as médias.

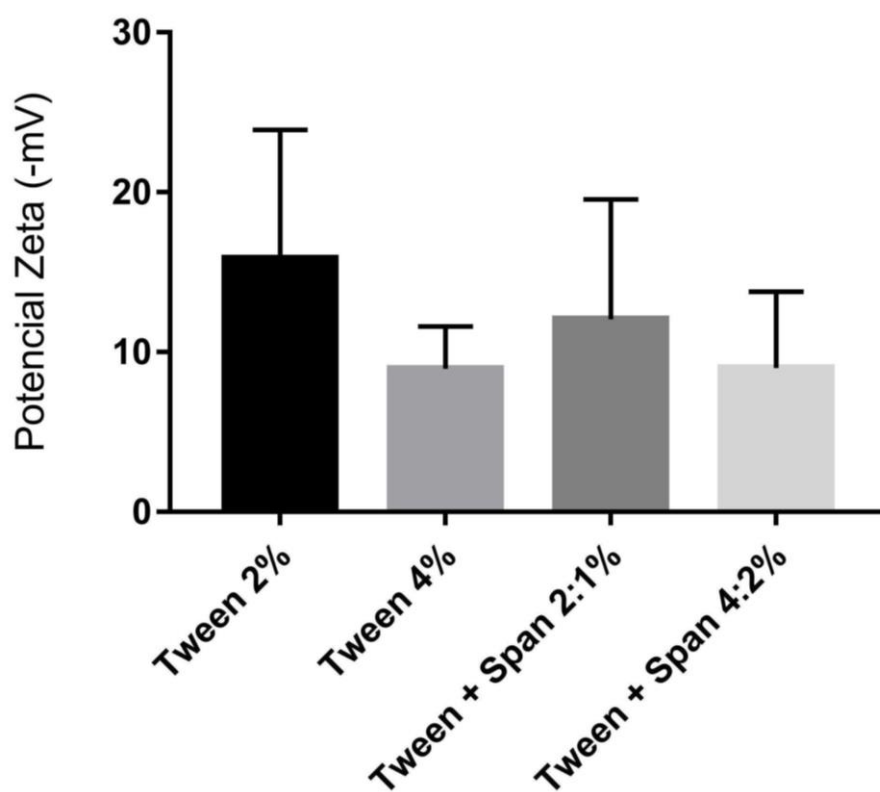


**Tabela 5:** Potencial zeta médio das nanoformulações em relação às concentrações de tensoativos (Tween 80 e Span 80), quercetina e PEG 400.

<b>Compostos</b>	<b>Concentração</b>	<b>Potencial zeta</b>
Tween 80	2%	-15,9 ± 8,0
	4%	-8,9 ± 2,6
Tween 80 + Span 80	2:1%	-12,0 ± 7,5
	4:2%	-9,0 ± 4,7
Quercetina	0%	-6,9 ± 2,0
	0,1%	-9,9 ± 5,3
	0,25%	-18,5 ± 7,5
	0,5%	-10,5 ± 3,9
PEG 400	5%	-11,1 ± 6,2
	10%	-11,8 ± 7,0

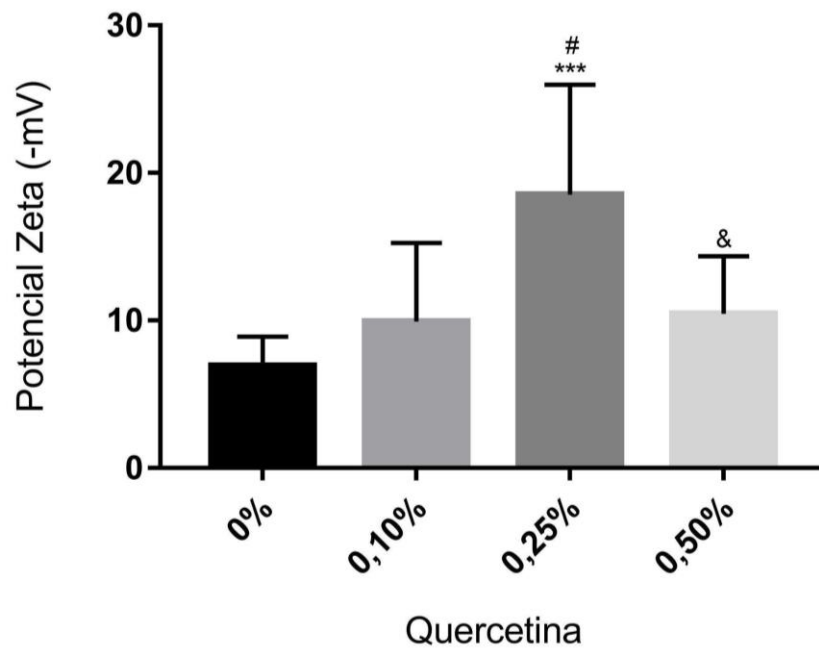
**Legenda:** Valores expressos em média ± desvio padrão da média.

**Figura 15:** Valores médios do potencial zeta das nanoformulações em relação à concentração dos tensoativos Tween e Span.



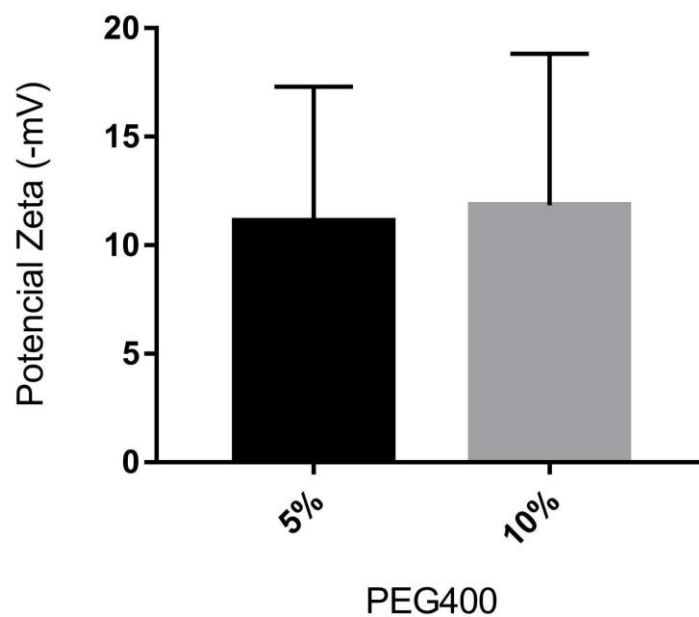
**Legenda:** Os dados são apresentados em médias com marcadores de desvio padrão; ANOVA de uma via, sendo  $p \geq 0,05$ ; diferenças entre as médias não significativas.

**Figura 16:** Valores médios do potencial zeta das formulações em relação à concentração de quercetina.



**Legenda:** Os dados são apresentados em médias com marcadores de desvio padrão; ANOVA de uma via, seguida por teste *post-hoc* de Tukey; símbolos distintos representam as diferenças significativas entre as médias, sendo \*\*\*  $p \leq 0,001$  em relação a 0% de quercetina; #  $p \leq 0,05$  em relação a 0,1% de quercetina e &  $p \leq 0,05$  em relação a 0,25% de quercetina.

**Figura 17:** Valores médios do potencial zeta das nanoformulações em relação à concentração de PEG 400.



**Legenda:** Os dados são apresentados em médias com marcadores de desvio padrão; Teste T não pareado, sendo  $p \geq 0,05$ ; diferenças entre as médias não significativas.

Os resultados indicam que as concentrações de tensoativos e PEG400 investigadas não afetaram significativamente o potencial zeta das formulações. Por outro lado, esta variável mostrou-se diretamente relacionada à concentração de quercetina. No intervalo entre 0-0,25% de concentração daquele flavonoide os valores de potencial zeta aumentaram em módulo, com o resultado mais significativo na concentração de 0,25%. De outra forma, nas nanoformulações contendo 0,5% de quercetina o potencial zeta diminuiu, o que pode estar relacionado à saturação do sistema. Assim, uma vez em excesso na formulação, a quercetina pode não agregar-se completamente às nanopartículas, o que também pode ser corroborado com os valores de PDI naquela concentração (0,5%), os quais indicaram uma maior polidispersão do sistema. Além disso, o potencial zeta das formulações foi determinado por cargas negativas, as quais podem estar relacionadas ao grupos hidroxilas ionizados presentes nas moléculas de quercetina, ao uso de tensoativos não iônicos e ao pH do meio (FARDOUS *et al.*, 2021). Resultados semelhantes foram observados em outros estudos com nanoemulsões à base de quercetina (ARBAIN *et al.*, 2018; GOKHALE *et al.*, 2019; SON *et al.*, 2019; TRAN *et al.*, 2014; VAZ *et al.*, 2020)

O potencial zeta é um parâmetro que mede as cargas superficiais das nanopartículas e suas interações em soluções iônicas (CLOGSTON & PATRI, 2011). Ele também atua como um indicador da estabilidade de nanoemulsões. Em geral, cargas elétricas altas ( $> \pm 30$  mV) impedem a agregação das nanopartículas por conta das fortes forças repulsivas entre as mesmas, enquanto valores de potencial zeta entre -10 e +10 mV são consideradas neutros (CLOGSTON & PATRI, 2011; TRAN *et al.*, 2014). Assim, maior estabilidade do sistema nanoestruturado é esperada com valores de potencial zeta próximos ou maiores que  $\pm 30$  mV (TRAN *et al.*, 2014; FARDOUS *et al.*, 2021). No presente estudo, o potencial zeta das formulações permaneceu no intervalo entre -6,9 mV e -18,9 mV, podendo ser considerado ligeiramente neutro. Apesar de serem menores que -30mV, os dados devem ser corroborados com os estudos de estabilidade para verificação da integridade do sistema ao longo do tempo. Contudo, os valores de potencial zeta obtidos na caracterização foram considerados adequados para o produto.

### **5.1.3 Estudo de estabilidade acelerada e estresse térmico**

As análises de estabilidade acelerada realizadas em equipamento LUMiSizer traçaram um perfil de separação de fases para cada formulação, gerando informações que podem correlacionar-se com a estabilidade dos sistemas nanoestruturados ao longo do tempo. O LUMiSizer é um analisador de dispersão utilizado para caracterizar os fenômenos de

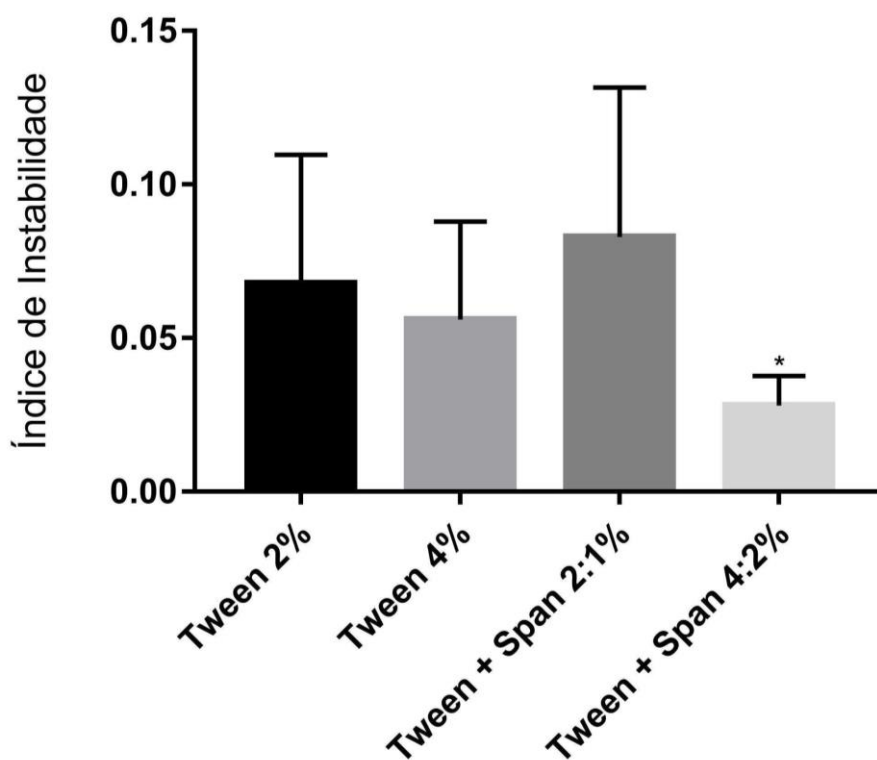
desestabilização em sistemas coloidais, registrando a progressão dos perfis de separação e a cinética do processo, o que permite a comparação e análise do comportamento de cada amostra individualmente (ZIELIŃSKA *et al.*, 2018). Assim, é possível identificar a ocorrência de eventos como *creaming*, sedimentação, floculação, coalescência, inversão de fases, entre outros, simulando o efeito do tempo na estabilização das formulações (ZIELIŃSKA *et al.*, 2020). No presente estudo, a análise foi conduzida baseando-se em uma simulação de 8 meses, resultando na determinação de um índice de instabilidade para cada formulação, conforme apresentado na Tabela 6.

**Tabela 6:** Índice de instabilidade das nanoformulações, conforme as concentrações de tensoativos, quercetina e PEG400 estudadas.

Compostos	Concentração	Índice de instabilidade
Tween 80	2%	0,068 ± 0,04
	4%	0,056 ± 0,03
Tween 80 + Span 80	2:1%	0,083 ± 0,05
	4:2%	0,028 ± 0,01
Quercetina	0%	0,084 ± 0,04
	0,1%	0,085 ± 0,04
	0,25%	0,041 ± 0,02
	0,5%	0,024 ± 0,01
PEG 400	5%	0,061 ± 0,04
	10%	0,056 ± 0,04

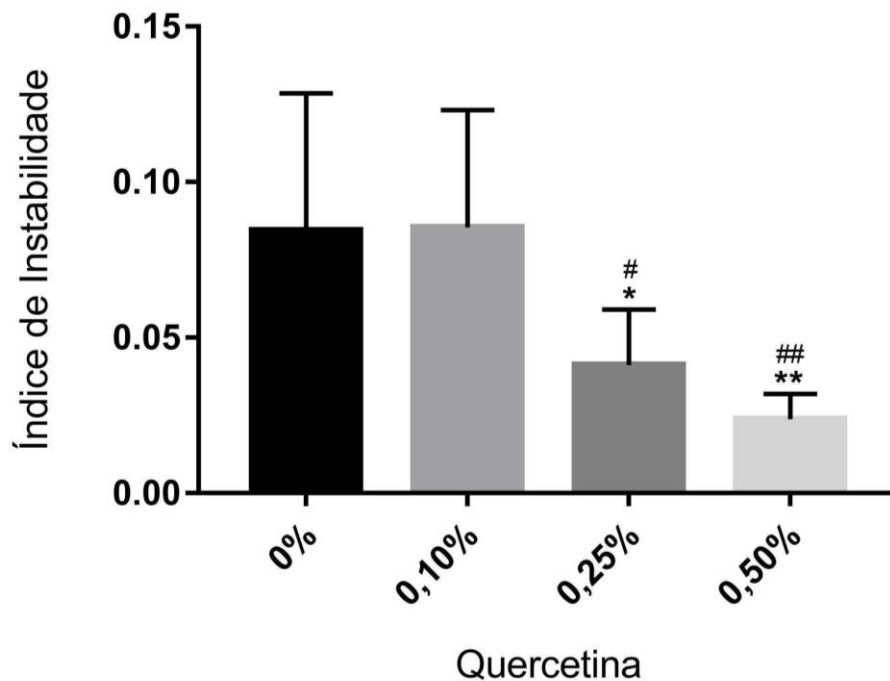
**Legenda:** Valores expressos em média ± desvio padrão.

**Figura 18:** Médias do índice de instabilidade das nanoformulações em relação à concentração de tensoativos (Tween e Span).



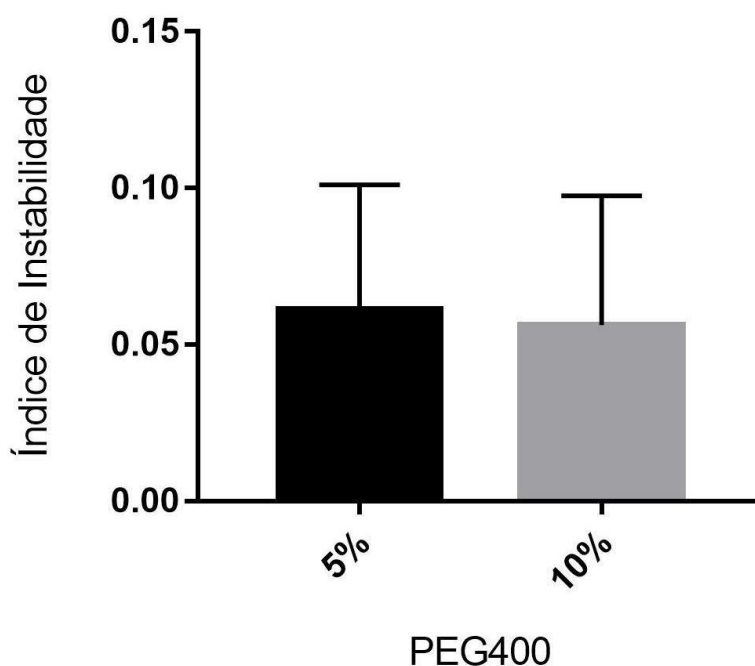
**Legenda:** Os dados são apresentados em médias com marcadores de desvio padrão; ANOVA de uma via, seguida por teste *post-hoc* de Tukey; símbolos distintos representam as diferenças significativas entre as médias, sendo \*  $p \leq 0,05$  em relação a Tween + Span 2:1%.

**Figura 19:** Valores médios do índice de instabilidade das nanoformulações em relação à concentração de quercetina.



**Legenda:** Os dados são apresentados em médias com marcadores de desvio padrão; ANOVA de uma via, seguida por teste *post-hoc* de Tukey; símbolos distintos representam as diferenças significativas entre as médias, sendo \*  $p \leq 0,05$  em relação a 0% de quercetina; \*\*  $p \leq 0,01$  em relação a 0% de quercetina; #  $p \leq 0,05$  em relação 0,1% de quercetina e ##  $p \leq 0,01$  em relação a 0,1% de quercetina.

**Figura 20:** Médias do índice de instabilidade das nanoformulações em relação à concentração de PEG 400.



**Legenda:** Os dados são apresentados em médias com marcadores de desvio padrão; Teste T não pareado, sendo  $p \geq 0,05$ ; diferenças entre as médias não significativas.

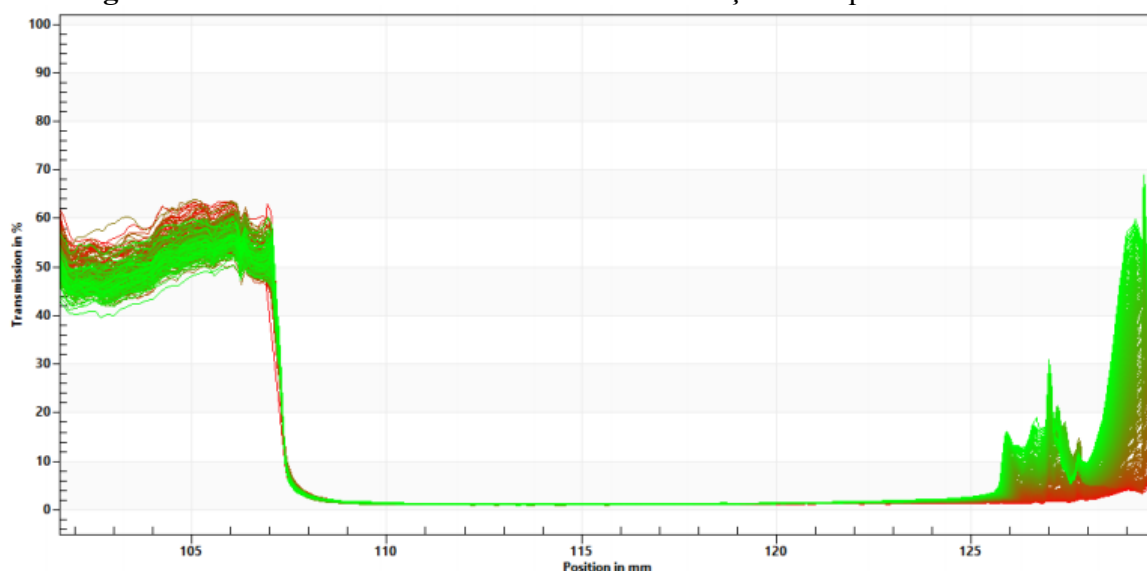
Baixos valores do índice de instabilidade foram observados em formulações contendo Tween 80 + Span 80 (4: 2%), sendo significativamente menores em relação ao detectado na combinação daqueles tensoativos na proporção 2: 1%. Este resultado indica que o aumento da concentração de tensoativos, quando combinados, impulsiona a estabilização dos sistemas, efeito que pode estar relacionado à diminuição da tensão superficial entre as fases oleosas e aquosas das nanoemulsões promovida pelos surfactantes. Uma redução no índice de instabilidade foi observada com a elevação da concentração de quercetina, i.e., a 0,25% e 0,5% do ativo. Contudo, estes dados devem ser corroborados com as análises de estabilidade por estresse térmico, pois, conforme descrito na seção anterior (item 5.1.2.2), a concentração de 0,5% daquele flavonoide foi considerada o limite de uso e/ou saturação, estando associada à uma maior polidispersão dos sistemas nanoestruturados em investigação. Uma vez que as análises via LUMiSizer baseiam-se na separação de fases, ao submeter um sistema saturado à separação, pode ser que o processo não ocorra adequadamente, ou seja, não há como separar o que já está separado/desestabilizado.

O índice de instabilidade é uma variável que permite a avaliação quantitativa da estabilidade das formulações. Ele é obtido através da comparação dos perfis de transmitância

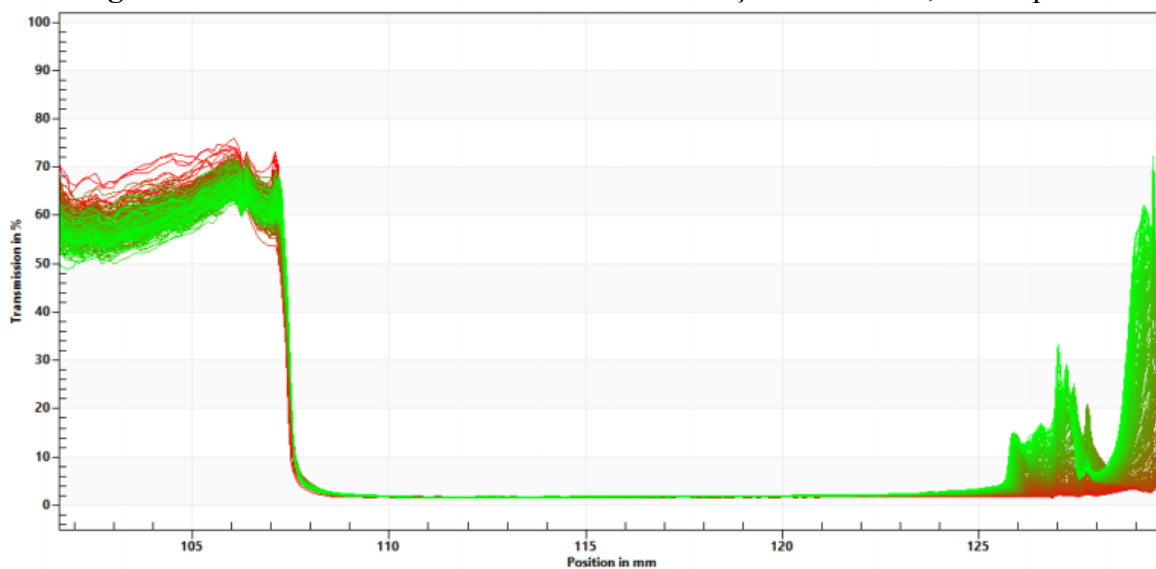


resultantes da separação das fases promovida pela centrifugação em dado tempo determinado. Durante a análise, o equilíbrio estável da nanodispersão é rompido por conta da ação da força centrífuga, resultando na desestabilização do sistema e possibilitando a determinação do índice de instabilidade do sistema, o qual pode ser definido como uma medida adimensional que varia de 0 (transmitância menor, mais estável) a 1 (transmitância maior, mais instável) (COLLADO-GONZÁLEZ *et al.*, 2020; ZIELIŃSKA *et al.*, 2020). As figuras 21, 22, 23 e 24 ilustram os diferentes perfis de transmitância observados em 4 formulações idênticas, no que concerne às concentrações de tensoativos e PEG 400, variando apenas em relação à concentração de quercetina.

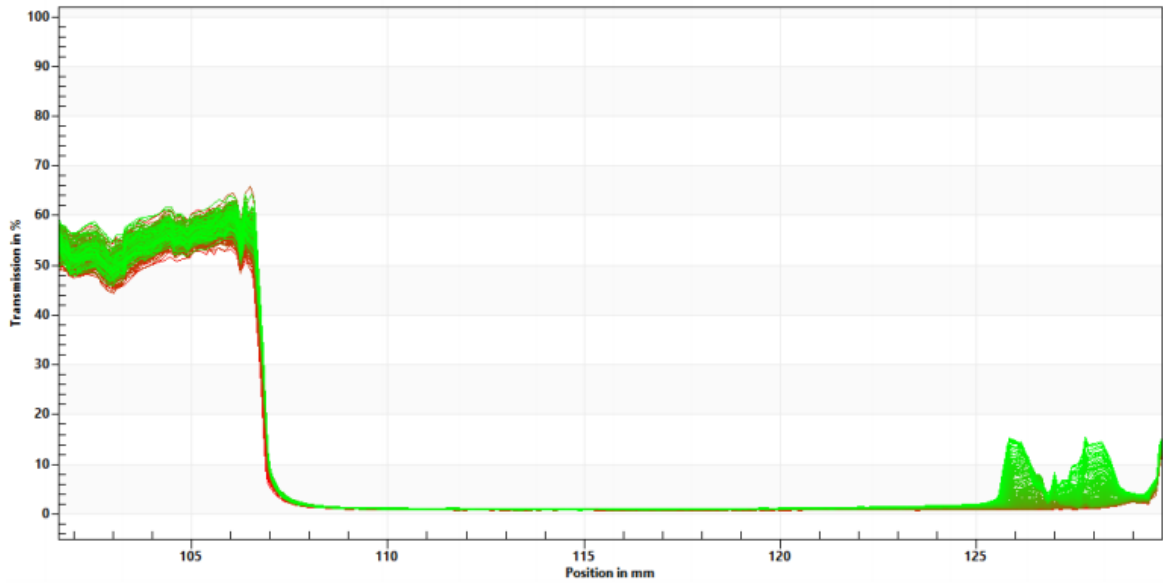
**Figura 21:** Perfis de transmitância da nanoformulação sem quercetina.



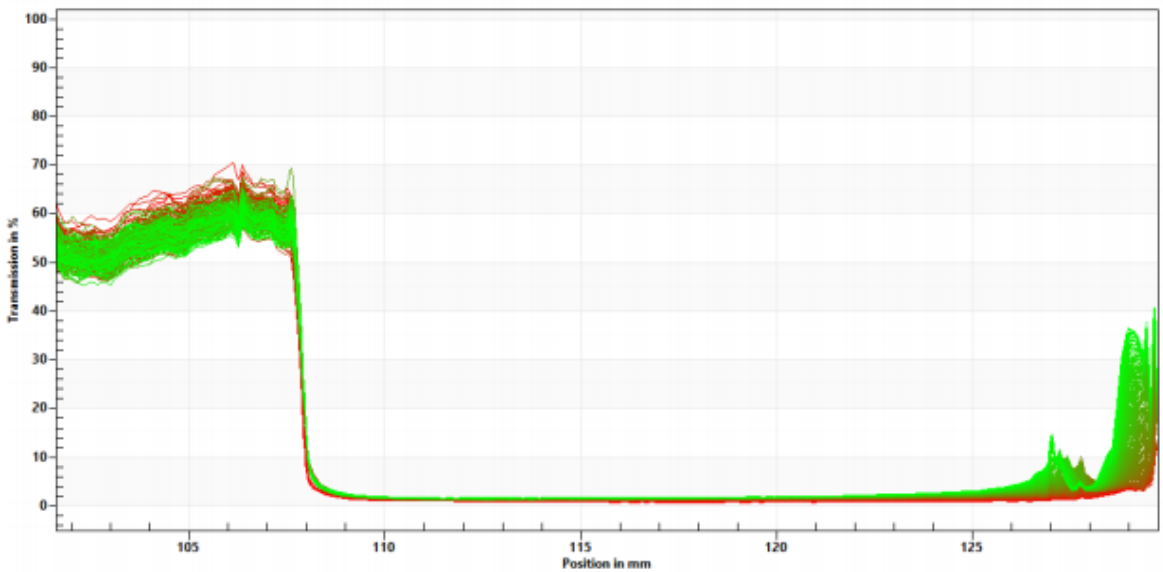
**Figura 22:** Perfis de transmitância da nanoformulação contendo 0,1% de quercetina.



**Figura 23:** Perfis de transmitância da nanoformulação contendo 0,25% de quercetina.



**Figura 24:** Perfis de transmitância da nanoformulação contendo 0,5% de quercetina.



Os diferentes perfis de transmitância permitem detectar visualmente variações de comportamento apresentadas pelas nanoformulações durante o processo de desestabilização. Nas figuras 21, 22, 23 e 24 os espectros em vermelho referem-se às primeiras varreduras realizadas, enquanto os espectros verdes referem-se às últimas varreduras realizadas no tempo experimental pré-estabelecido. Os picos presentes nos espectros apontam para posições em que a luz foi transmitida nas formulações. As demais regiões dos espectros com ausência de picos indicam a absorção de luz e, dessa forma, os espectros indicam que todas as nanoformulações sofreram eventos de *creaming*, pois não há transmitância na janela espectral de 110-120 mm.

Ao comparar as figuras 21, 22, 23 e 24, é possível constatar que a formulação contendo 0,25% de quercetina apresentou transmitâncias menores em relação a todas as demais, enquanto a nanoformulação com 0,5% daquele flavonoide apresentou menores transmitâncias em relação à 0% e 0,1%. Porém, quando olhados isoladamente, estes resultados podem indicar tanto a ocorrência de sedimentação, quanto a não separação das fases, o que impacta diretamente na inferência da estabilidade do sistema. Neste caso, os dados devem ser corroborados com os demais testes para que a interpretação seja mais assertiva.

Outro dado interessante fornecido pela análise do LUMiSizer é a velocidade em que as fases são separadas no processo de centrifugação. A tabela 7 indica os resultados obtidos de acordo com as variações nas concentrações dos componentes das formulações.

**Tabela 7:** Velocidade ( $\mu\text{m/s}$  e  $\text{mm/dia}$ ) de separação das nanoformulações em relação à variação na concentração de tensoativos, quercetina e PEG 400.

Compostos	Concentração	Velocidade ( $\mu\text{m/s}$ )	Velocidade ( $\text{mm/dia}$ )
Tween 80	2%	$-0,27 \pm 0,16$	$-23,36 \pm 14,69$
	4%	$-0,20 \pm 0,05$	$-17,59 \pm 4,04$
Tween 80 + Span 80	2:1%	$-0,25 \pm 0,12$	$-21,78 \pm 10,31$
	4:2%	$-0,24 \pm 0,07$	$-20,44 \pm 6,68$
Quercetina	0%	$-0,21 \pm 0,06$	$-17,97 \pm 5,22$
	0,1%	$-0,22 \pm 0,04$	$-19,30 \pm 3,15$
	0,25%	$-0,26 \pm 0,08$	$-22,48 \pm 7,01$
	0,5%	$-0,27 \pm 0,20$	$-23,84 \pm 18,28$
PEG 400	5%	$-0,24 \pm 0,13$	$-21,44 \pm 12,10$
	10%	$-0,23 \pm 0,08$	$-20,21 \pm 6,90$

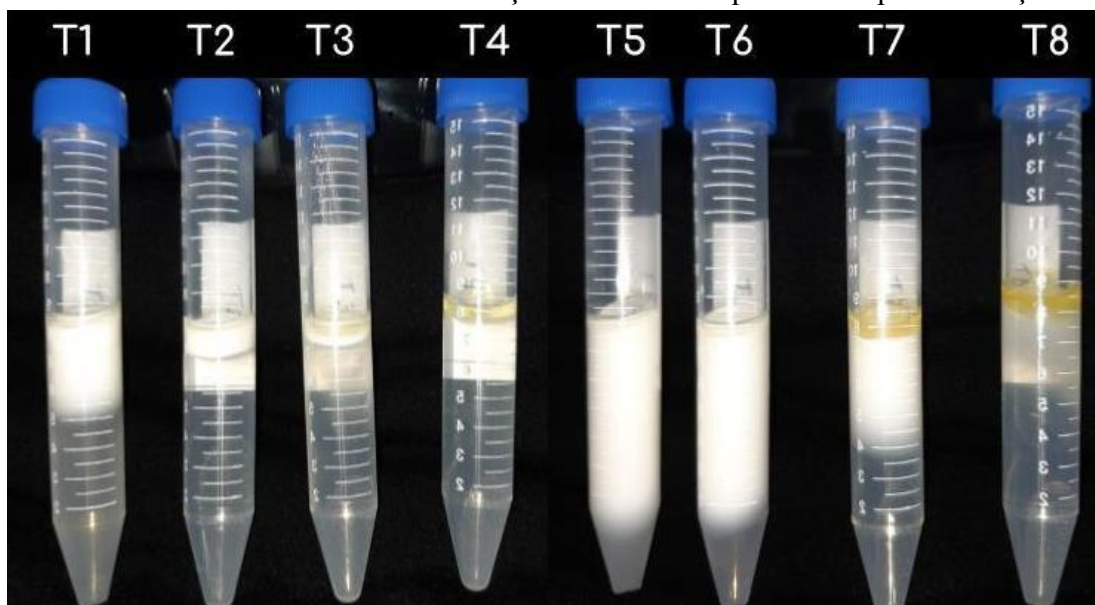
**Legenda:** Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA de uma via, seguida por teste *post-hoc* de Tukey;  $p \geq 0,05$  com diferenças entre as médias não significativas.

Em relação à velocidade de separação de fases, os sistemas apresentaram comportamentos semelhantes, não havendo variações significativas entre os grupos avaliados. Neste caso, as diferentes concentrações dos componentes não exerceram efeitos expressivos no tempo de desestabilização de cada fórmula. Assim, pode-se estimar que as fases do sistema desenvolvido no presente estudo apresentarão uma separação média de cerca de 20 mm por dia,

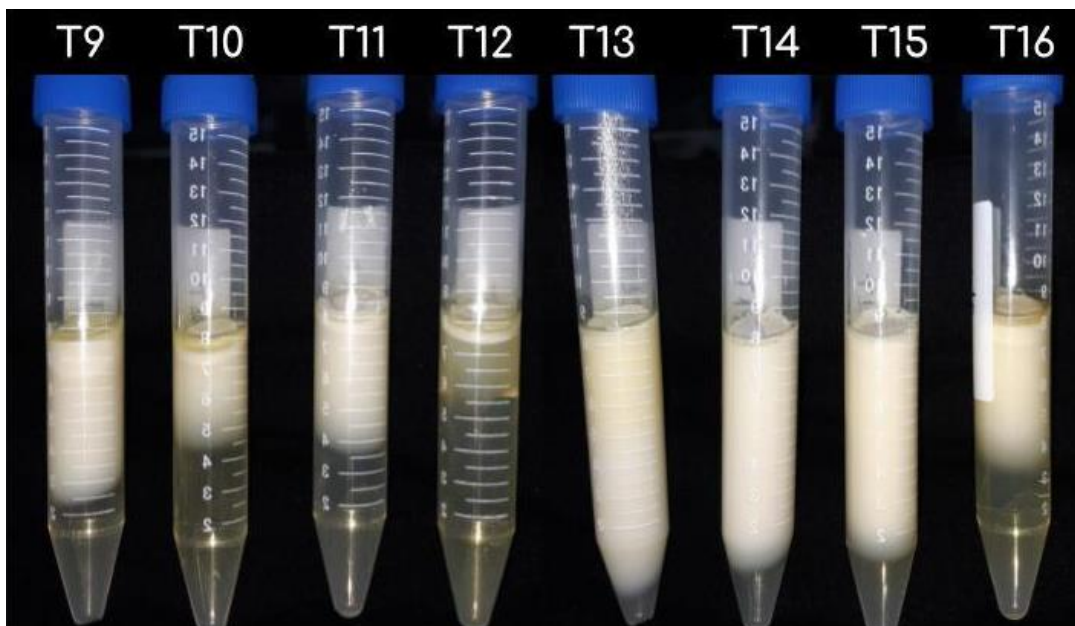
considerando um intervalo de tempo de 8 meses. Essa característica está diretamente relacionada à viscosidade das fases, as quais podem dificultar ou facilitar o movimento das nanopartículas durante a centrifugação (WANG *et al.*, 2020).

Em outra perspectiva, a estabilidade das formulações também foi avaliada quanto aos efeitos da temperatura por ensaio de estresse térmico, armazenando-se as amostras à 30°C e 40°C por cerca de três meses. Essa análise compreendeu a exposição das formulações à uma condição de aumento de energia - no caso, térmica -, submetendo os sistemas nanoestruturados à uma situação de “estresse” para, assim, obter informações a respeito da estabilidade dos mesmos. Os resultados de armazenamento à 30°C são apresentados nas figuras 25, 26, 27 e 28, enquanto aqueles oriundos do experimento à 40°C são mostrados nas figuras 29, 30, 31 e 32.

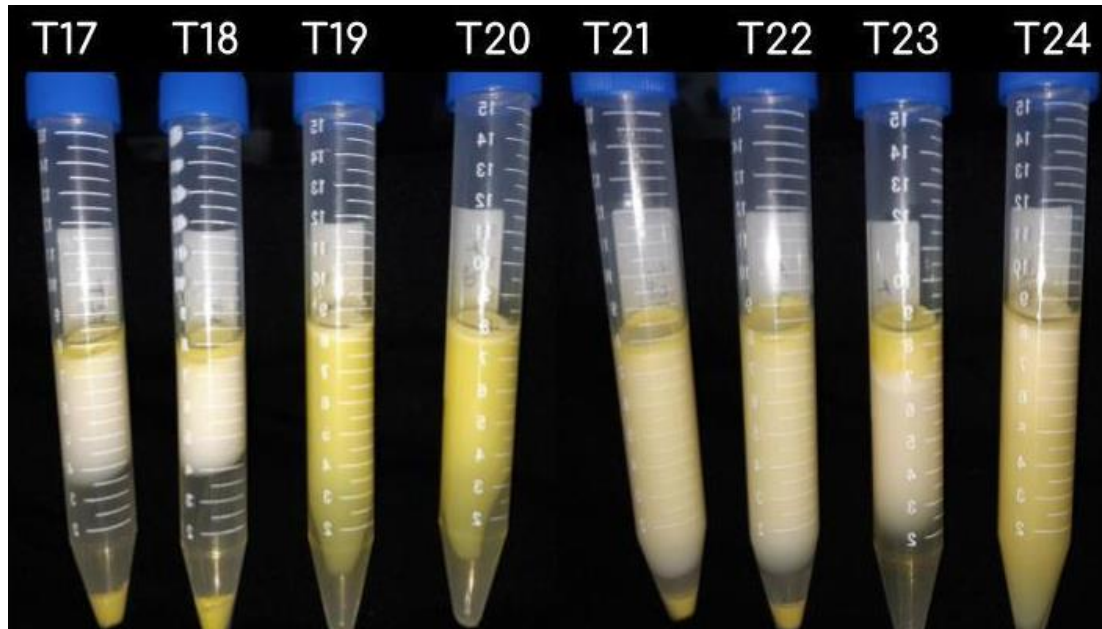
**Figura 25:** Detalhe visual das nanoformulações com 0% de quercetina após incubação à 30°C.



**Figura 26:** Aspecto visual das nanoformulações contendo 0,1% de quercetina após incubação à 30°C.

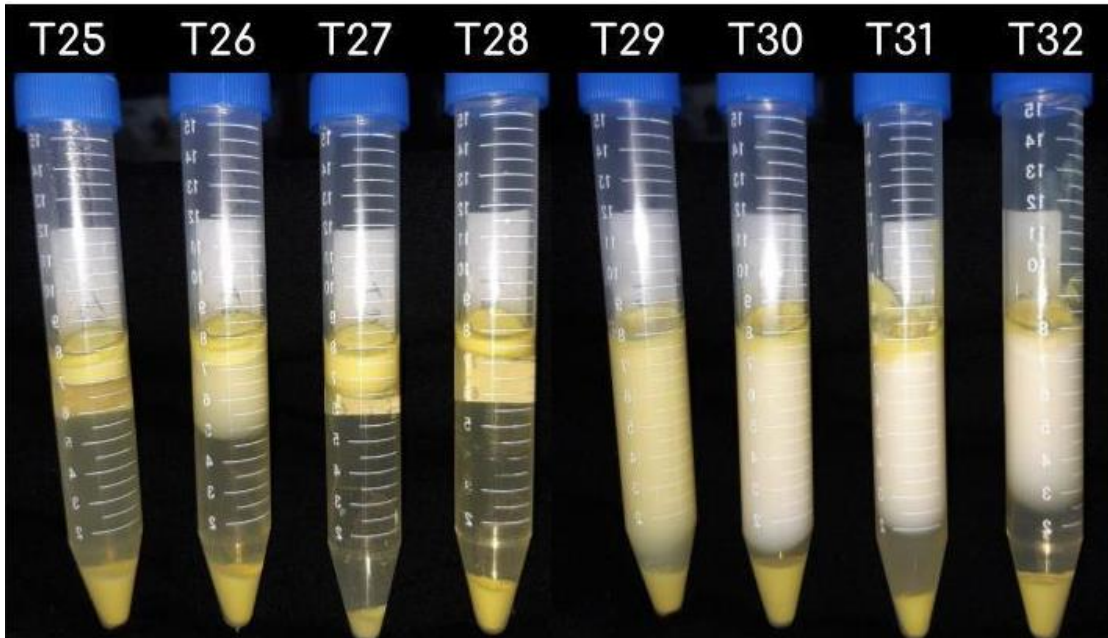


**Figura 27:** Detalhe visual das nanoformulações com 0,25% de quercetina após incubação à 30°C.

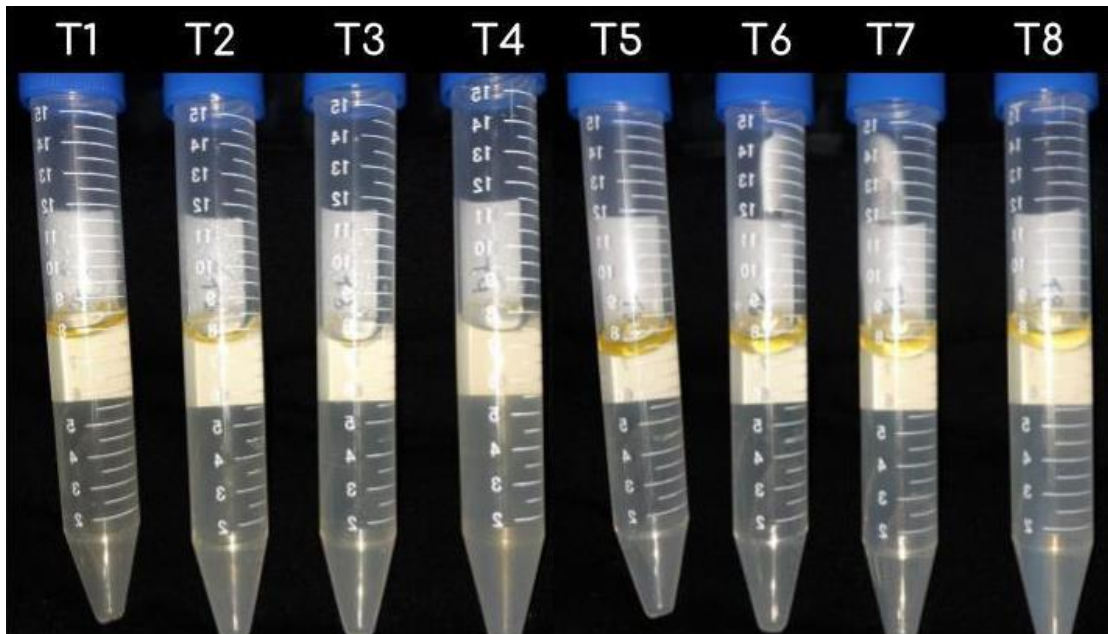




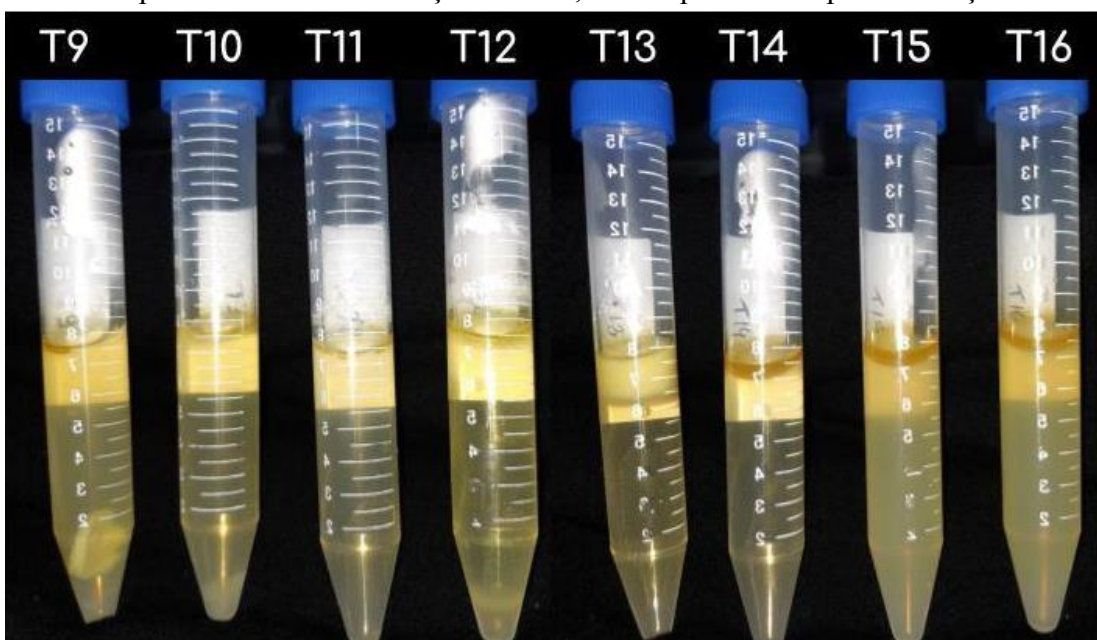
**Figura 28:** Aspecto visual das nanoformulações contendo 0,5% de quercetina após incubação à 30°C.



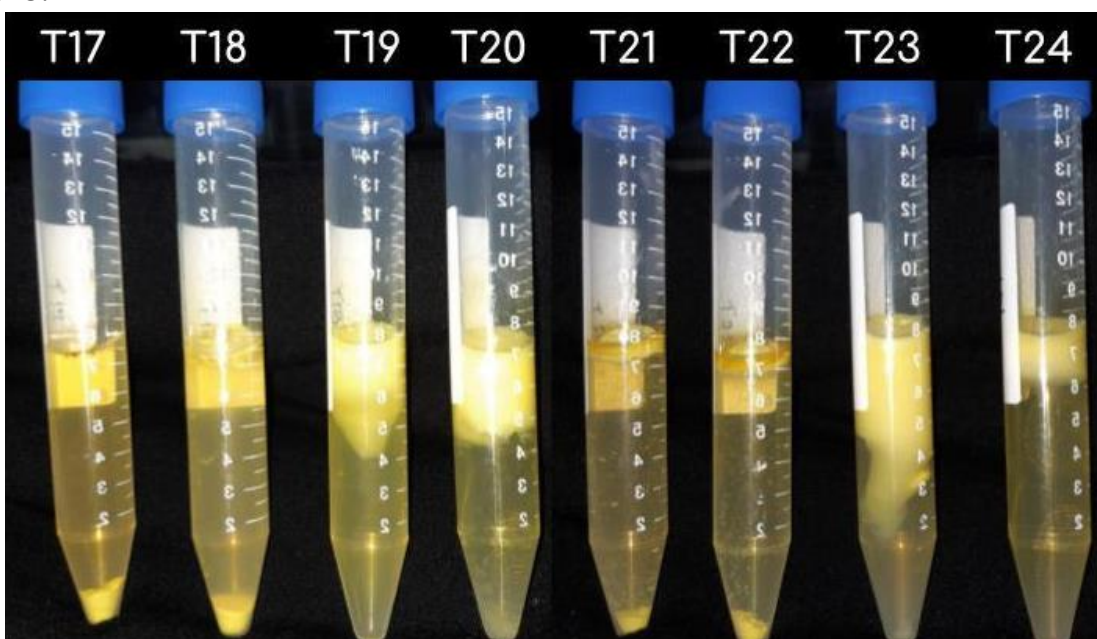
**Figura 29:** Detalhe da aparência das nanoformulações com 0% de quercetina após incubação à 40°C.



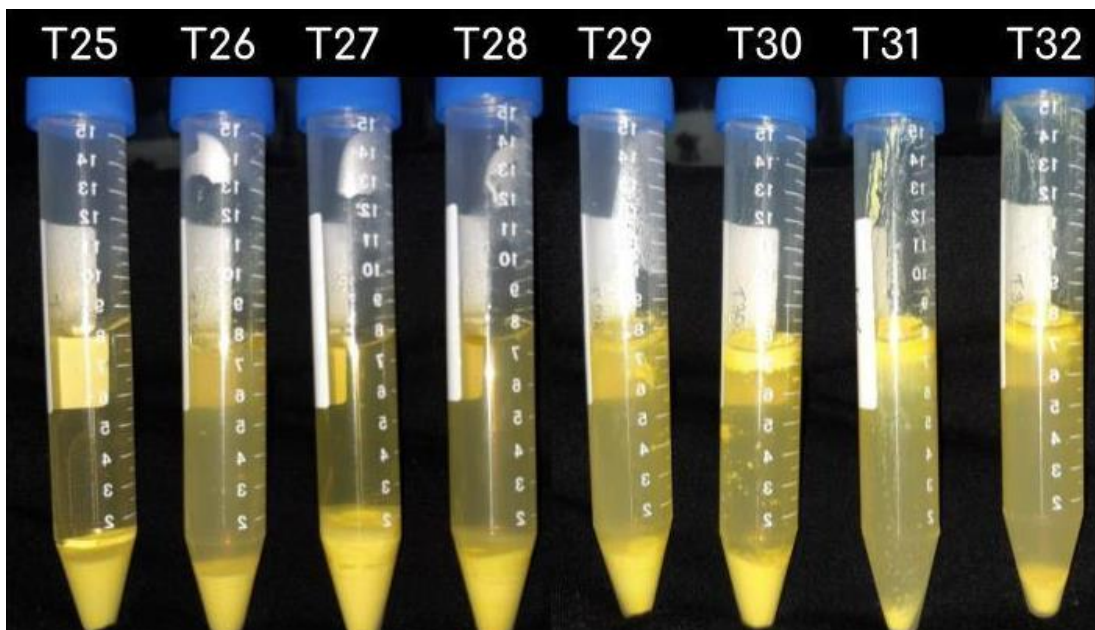
**Figura 30:** Aspecto das nanoformulações com 0,1% de quercetina após incubação à 40°C.



**Figura 31:** Aspecto visual das nanoformulações contendo 0,25% de quercetina após incubação à 40°C.



**Figura 32:** Detalhe visual das nanoformulações com 0,5% de quercetina após incubação à 40°C.



A análise das figuras 25-32 permite observar que todas as formulações sofreram algum impacto pela alteração de temperatura. Em geral, os sistemas se comportaram de forma similar à 30°C e 40°C, diferindo apenas na intensidade com que a desestabilização foi impulsionada nesta última condição térmica. Como resultado, as formulações contendo 0% e 0,1% de quercetina apresentaram apenas o evento de *creaming*. Por sua vez, aquelas contendo 0,25% do flavonoide evidenciaram um comportamento dependente da concentração de tensoativos. Assim, as formulações contendo 4% de Tween 80 e Tween 80 + Span 80 na proporção 4: 2% apresentaram apenas o evento de *creaming*, enquanto aquelas que continham 2% de Tween 80 e Tween 80 + Span 80 (2: 1%) evidenciaram tanto eventos de *creaming* como de sedimentação, sugerindo que o Tween 80 é o surfactante que desempenha maior atividade na estabilização das fórmulas. Por fim, todas as formulações contendo 0,5% de quercetina apresentaram *creaming* e sedimentação. Cabe ressaltar que uma das amostras (identificada como T24) não apresentou separação à 30°C, a qual era composta por 0,25% de quercetina, 4: 2% de Tween 80 + Span 80 e 10% de PEG400. Assim, a T24 foi considerada a formulação mais estável de todas e seus parâmetros tido como referenciais.

As nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis e estão suscetíveis a uma série de fatores físico-químicos que podem levar à desestabilização. Dentre eles, a temperatura de armazenamento é uma das variáveis condicionantes da integridade dos produtos. No presente estudo, através dos ensaios de estresse térmico, três fenômenos de desestabilização dos sistemas nanoestruturados foram detectados: separação de fases, *creaming* e sedimentação. A separação



é caracterizada pela formação de duas fases claras na nanoemulsão, as quais resultam da ação da força gravitacional sob o sistema, juntamente com a diferença de densidade entre as fases (LIU *et al.*, 2019). Em geral, a fase aquosa tende a se mover para a porção inferior do sistema, enquanto a fase oleosa situa-se na porção superior (LIU *et al.*, 2019). Já o *creaming* é caracterizado pela flutuação ou assentamento das nanopartículas, as quais migram para a parte superior ou inferior do sistema e apresentam aspectos de opacidade e cremosidade (KARTHIK *et al.*, 2015). Por fim, a sedimentação ocorre quando algum componente da nanoemulsão apresenta densidade maior que a fase aquosa, migrando para a porção inferior do sistema por conta da força gravitacional (KARTHIK *et al.*, 2015).

Em suma, os resultados desta análise podem ser corroborados com os dados obtidos na caracterização físico-química e no ensaio de estabilidade acelerada. Novamente, é possível constatar que o uso de quercetina nas concentrações de 0,1% e 0,25% é o mais adequado, juntamente com a combinação de Tween 80 + Span 80 na proporção 4: 2%. Os altos índices de sedimentação apresentados pelas formulações contendo 0,5% de quercetina provavelmente estão relacionados à saturação do ativo nos sistemas. Já as diferentes concentrações de PEG 400 parecem não impactar na estabilidade. Conforme observado nos experimentos à determinação do índice de instabilidade, a maioria das formulações apresentou apenas o evento de *creaming*, enquanto algumas evidenciaram *creaming* e sedimentação. Assim, de acordo com os resultados obtidos, a nanoformulação escolhida para compor os demais testes continha 0,1% de quercetina e Tween 80 + Span 80 na razão 4: 2%. Além disso, a concentração de PEG 400 foi adequada para 1%, visto que o solvente não impacta nas propriedades físico-químicas das nanoemulsões e o ativo continua sendo solubilizado nesta concentração.

#### **5.1.4 Incorporação de carragenana**

A incorporação de carragenana na formulação escolhida foi realizada visando a obtenção de um revestimento polimérico das nanopartículas, tanto por questões de estabilização do sistema, quanto pela soma da atividade biológica do polissacarídeo. Neste caso, foram realizados testes com os três tipos de carragenanas ( $\kappa$ ,  $\lambda$  e  $\iota$ ) para, assim, determinar qual destes melhor se adequaria ao produto final.

#### 5.1.4.1 $\kappa$ -carragenana

Os testes com  $\kappa$ -carragenana foram realizados com quatro concentrações do polissacarídeo, tendo como limite o teor de 0,5%. Formulações contendo 0,6%, 0,75% e 1% também foram inicialmente consideradas, porém, nestes casos, as amostras apresentaram solidificação em temperatura ambiente, o que impossibilitou seu uso. A tabela 8 indica os resultados da caracterização físico-química das nanoformulações contendo  $\kappa$ -carragenana para cada condição avaliada.

**Tabela 8:** Caracterização físico-química das nanoformulações de acordo com a concentração de  $\kappa$ -carragenana em estudo.

Concentração de $\kappa$ -carragenana	Tamanho das nanopartículas (nm)	PdI	Potencial zeta (-mV)
0%	100,3	0,196	-3,36
0,1%	137,0	0,226	-12,0
0,25%	200,0	0,279	-10,9
0,4%	207,8	0,187	-16,9
0,5%	189,8	0,233	-14,9

Os resultados indicaram uma relação proporcional entre a concentração do polissacarídeo e as demais características do sistema. Apesar da maioria dos valores das variáveis físico-químicas investigadas aumentarem em comparação ao grupo controle (0% de  $\kappa$ -carragenana), todos permaneceram dentro de intervalos aceitáveis para o uso pretendido das nanoformulações. As alterações observadas já eram, de certa forma, esperadas, pois ao incorporar um novo composto em um sistema dinâmico como uma nanoemulsão, as interações presentes na formulação também sofrem alterações. O aumento do tamanho das nanopartículas observado indicou que a incorporação do polissacarídeo ao sistema foi efetiva. Já o aumento nos valores do potencial zeta está relacionado à presença de cargas negativas nos grupamentos sulfatos das moléculas de  $\kappa$ -carragenana. Em suma, todas as formulações se mostraram próprias para uso.

#### 5.1.4.2 $\lambda$ -carragenana

Os testes com  $\lambda$ -carragenana foram realizados com cinco concentrações do polissacarídeo, sendo os resultados da caracterização físico-química para cada condição avaliada apresentados na tabela 9.

**Tabela 9:** Caracterização físico-química das nanoformulações de acordo com a concentração de  $\lambda$ -carragenana.

Concentração de $\lambda$ -carragenana	Tamanho das nanopartículas (nm)	PdI	Potencial zeta (-mV)
0%	100,3	0,196	-3,36
0,4%	171,0	0,329	-15,8
0,5%	178,0	0,309	-13,5
0,6%	226,9	0,317	-18,1
0,7%	357,8	0,266	-21,8
0,8%	385,8	0,211	-18,5

A incorporação de  $\lambda$ -carragenana não foi adequada à composição do sistema, pois o tamanho das nanopartículas e o PdI das formulações aumentaram de forma a ultrapassar os limites aceitáveis para as nanoemulsões. As oscilações entre os parâmetros em relação às diferentes concentrações do polissacarídeo também ilustram a instabilidade do polissacarídeo perante a dinâmica do sistema. O aumento dos valores de potencial zeta é decorrente das cargas negativas características das moléculas de  $\lambda$ -carragenana. Em suma, o aumento exacerbado no tamanho das nanopartículas e o PdI acima do limite de 0,3 ilustram um sistema composto por nanopartículas muito grandes e com maior polidispersão, sendo, portanto, considerado ineficiente para o uso.

#### 5.2.4.3 $\iota$ -carragenana

Por fim, os testes com  $\iota$ -carragenana foram realizados com sete concentrações do polissacarídeo e a tabela 10 apresenta os resultados da caracterização físico-química para cada condição experimental avaliada.

**Tabela 10:** Caracterização físico-química das nanoformulações de acordo com a concentração de ι-carragenana.

<b>Concentração de ι-carragenana</b>	<b>Tamanho das nanopartículas (nm)</b>	<b>PdI</b>	<b>Potencial zeta (-mV)</b>
0%	100,3	0,196	-3,36
0,4%	119,9	0,167	-9,26
0,5%	113,7	0,132	-16,8
0,6%	144,0	0,195	-8,41
0,7%	152,0	0,197	-9,55
0,8%	178,0	0,213	-14,0
1%	160,0	0,301	-25,6
1,5%	206,0	0,315	-43,1

A incorporação de ι-carragenana se mostrou adequada para a composição da formulação. O aumento no tamanho observado indica que o composto aderiu às nanopartículas e o revestimento polimérico foi efetivo, permanecendo dentro dos limites desejáveis àquela variável. Já o aumento do potencial zeta observado resultou das cargas negativas dos grupamentos sulfato característicos das moléculas de ι-carragenana. O PdI atingiu o valor máximo de 0,3 a partir da concentração de 1% do polissacarídeo, sendo este considerado o limite de uso do ativo polimérico no sistema nanoestruturado em desenvolvimento. Em suma, o nanossistema permaneceu íntegro após a incorporação de ι-carragenana e se mostrou adequado para uso pretendido, dentro do limite de concentração de 0,8% do polissacarídeo.

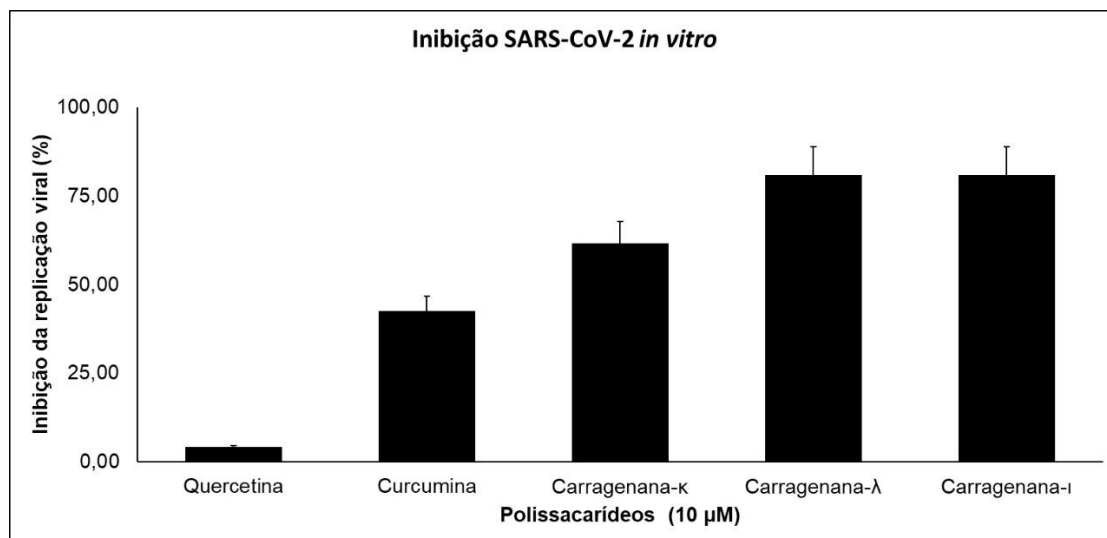
Por conta da instabilidade termodinâmica característica das nanoemulsões, a promoção da estabilidade sempre deve ser levada em consideração durante a projeção de uma nova fórmula. Deste modo, a adição de compostos estabilizantes como agentes de ponderação, inibidores de amadurecimento, espessantes e surfactantes, pode ser uma boa alternativa para manter a integridade do sistema, uma vez que o acréscimo destes componentes pode impactar positivamente nas características físico-químicas das formulações, como por exemplo: redução do tamanho das nanopartículas, aumento da viscosidade, diminuição do contraste de densidade e, conseqüentemente, da separação de fases (LIU *et al.*, 2019). Em relação à adição de polissacarídeos nas nanoemulsões, a alta viscosidade característica de muitas daquelas macromoléculas está associada à formação de uma rede íntegra de gotículas, promovendo, assim, a estabilidade do sistema (KARTHIK *et al.*, 2015). Além disso, a presença de grupos

iônicos nas moléculas poliméricas resulta no aumento da carga superficial das nanopartículas, a exemplo do observado com as carragenanas, o que impulsiona as forças repulsivas entre elas e impede agregações (RAI *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2019).

As carragenanas são polissacarídeos iônicos compostos por grupamentos sulfatos e galactoses, sendo comumente utilizadas pelas indústrias farmacêuticas e alimentícias, por conta de suas propriedades gelificantes e viscosificantes (ŚCIESZKA & KLEWICKA, 2018). Essas características têm sido apreciadas por pesquisadores que buscam a elaboração de sistemas nanoestruturados de entrega de ativos associados ao aumento da retenção, liberação e biodisponibilidade destes. Richa & Choudhury (2019) avaliaram uma série de polissacarídeos quanto à ação emulsificante em nanoemulsão de curcumina e constataram que  $\kappa$ -carragenana foi o composto de melhor performance, apresentando a maior eficiência de encapsulação do ativo. Resultados semelhantes foram observados por Lee *et al.* (2021) em nanocompósitos de curcumina e  $\iota$ -carragenana, os quais, além de aumentar a estabilidade e absorção do flavonóide, também promoveram as atividades antioxidantes e anti-inflamatórias por conta dos efeitos sinérgicos entre os compostos. Já Shanmugapriya *et al.* (2019) verificaram em modelo *in vivo* de diabetes que o uso de  $\kappa$ -carragenana em nanoemulsões de astaxantina para cicatrização da pele melhora o desempenho do ativo e aumenta o recobrimento cutâneo. Enquanto isso, Saravana *et al.* (2019) constataram que o revestimento polimérico de  $\kappa$ -carragenana em nanoemulsões alimentícias de fucoxantina aumenta a biodisponibilidade do ativo.

No presente estudo, tanto o revestimento com  $\kappa$ - quanto com  $\iota$ -carragenana se mostraram adequados às nanoformulações, enquanto que a incorporação de  $\lambda$ -carragenana apresentou resultados que ultrapassaram os limites pré-estabelecidos para PDI e tamanho das nanopartículas. Assim, entre os polissacarídeos efetivos, assumiu-se como critério de escolha o potencial antiviral dos mesmos em relação a vírus respiratórios, tendo em vista que a principal finalidade do estudo é o desenvolvimento de um antisséptico de alta atividade virucida contra o SARS-CoV-2. Além disso, resultados obtidos em ensaios preliminares de inibição da replicação viral pelos polissacarídeos livres em meio de cultura e não nanoencapsulados também foram considerados, os quais estão indicados pela figura 33.

**Figura 33:** Percentual de inibição da replicação viral de SARS-CoV-2 *in vitro* pelos compostos bioativos livres em meio de cultura (não nanoencapsulados).



Dentre os polissacarídeos que melhor se adequaram aos sistemas, a ι-carragenana apresentou o maior percentual de inibição da replicação de SARS-CoV-2, corroborando com estudos anteriores (BANSAL *et al.*, 2021; FREDIANSYAH, 2021; FRÖBA *et al.*, 2021; MOROKUTTI-KURZ *et al.*, 2021; SCHÜTZ *et al.*, 2021; BOVARD *et al.*, 2022). Assim, como resultado final, o polímero foi escolhido para compor a formulação.

### 5.1.5 Estudo da estabilidade físico-química de nanoformulações

Para a avaliação da estabilidade dos sistemas ao longo do tempo, duas formulações foram escolhidas para compor o estudo, sendo elas nomeadas como A e B, de acordo com as respectivas composições (Tabela 11).

**Tabela 11:** Composição das nanoformulações A e B.

Formulação	Componentes					
A	Óleo essencial de melaleuca	Tween 80	Span 80	-	-	ι-carragenana
B				Quercetina	PEG400	

**Legenda:** (-) ausência de quercetina e PEG400.

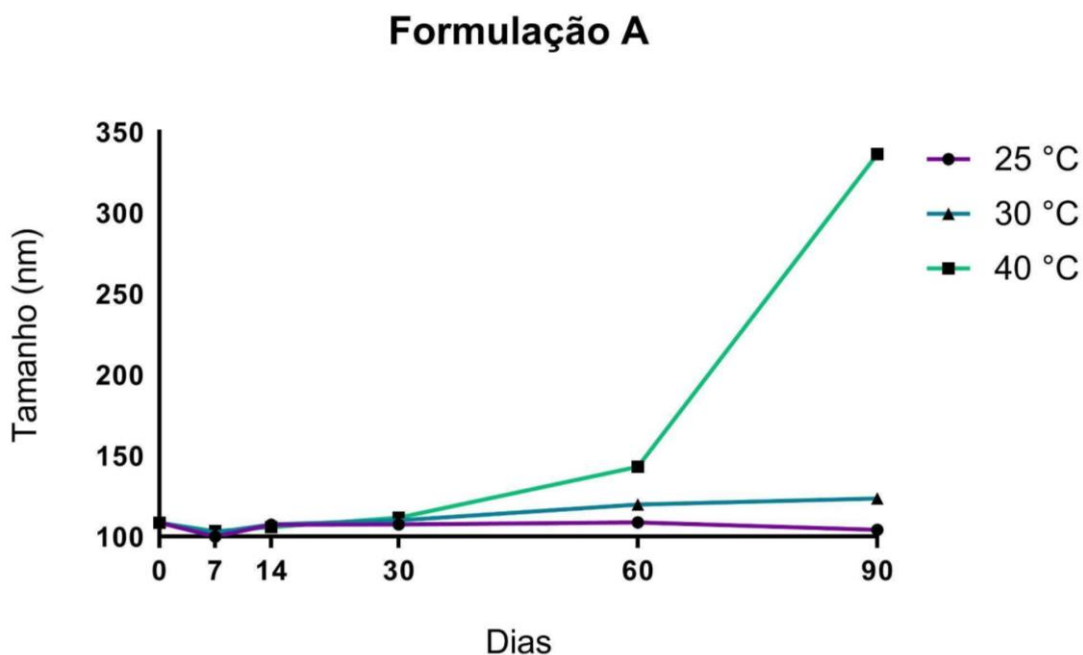
Durante o período de 3 meses, as duas formulações foram incubadas à 25°C, 30°C e 40°C e suas características físico-químicas foram monitoradas. Os resultados referentes ao tamanho das nanopartículas são apresentados na tabela 12 e ilustrados ns figuras 34 e 35.

**Tabela 12:** Tamanho das nanopartículas (nm) das formulações em estudo, em função da temperatura e tempo de incubação.

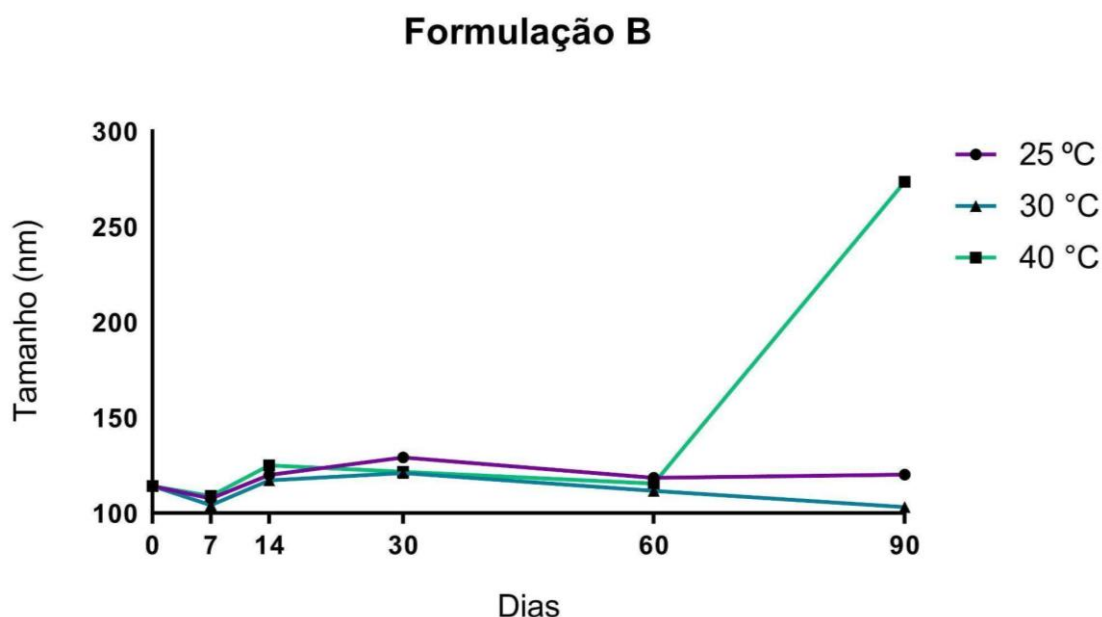
Dia	Formulação A			Formulação B		
	25°C	30°C	40°C	25°C	30°C	40°C
0		108,7 ± 5,39			114,2 ± 2,15	
7	100,1 ± 3,1	102,7 ± 5,2	103,4 ± 1,1	107,8 ± 3,9	104,3 ± 1,6	109,0 ± 2,2
14	107,4 ± 6,9	107,5 ± 4,1	106,0 ± 1,1	120,1 ± 9,8	117,2 ± 2,0	125,1 ± 6,1
30	107,6 ± 4,1	110,0 ± 3,3	111,7 ± 9,2	129,2 ± 11,7	121,1 ± 4,1	121,7 ± 4,5
60	108,9 ± 4,8	119,8 ± 14,5	143,2 ± 11,7	118,6 ± 3,9	111,8 ± 1,4	115,6 ± 2,7
90	104,2 ± 3,0	123,7 ± 10,4	336,2 ± 11,0	120,2 ± 1,0	103,3 ± 2,7	273,5 ± 13,9

**Legenda:** Valores expressos em média ± desvio padrão.

**Figura 34:** Tamanho das nanopartículas da formulação A em relação à temperatura e tempo de incubação.



**Figura 35:** Tamanho das nanopartículas da formulação B em relação à temperatura e tempo de incubação.



A análise das figuras 33 e 34 indica que a formulação B apresentou nanopartículas relativamente maiores do que a formulação A, o que já era de certa forma esperado, visto que aquela formulação possui dois compostos a mais, i.e., quercetina e PEG 400. Já em relação às variações de tamanho ao longo do tempo, na primeira semana as formulações apresentaram uma leve diminuição nos valores desta variável nas 3 temperaturas estudadas, seguido por um aumento ao final da segunda semana. Nos momentos amostrados aos 30 e 60 dias variações de tamanho foram também detectadas, porém as nanopartículas permaneceram dentro dos valores pré-estabelecidos para uso. Já ao final do terceiro mês, a formulação A se manteve estável à 25°C e 30°C, porém à 40°C o tamanho das nanopartículas aumentou expressivamente, alcançando a casa dos 300 nm. De forma semelhante, a formulação B se manteve estável à 25°C e 30°C e alcançou valores próximos a 250 nm à 40°C. Resultados semelhantes foram constatados por Mahadev et al. (2022) com nanoemulsões de quercetina, as quais apresentaram uma tendência ao aumento das nanopartículas durante o período de incubação de 45 dias em 30°C e 40°C, sendo o fenômeno mais expressivo na maior temperatura. Outros estudos com nanoemulsões de quercetina demonstram uma maior estabilidade de tamanho em incubações de 40°C ao longo do tempo, indicando que cada sistema se comporta de forma única e que a combinação dos demais componentes - como surfactantes e bioativos - exerce um papel crucial nas características físico-químicas (SON *et al.*, 2019; VAZ *et al.*, 2020).



No presente estudo, ao final do ensaio as formulações apresentaram tamanho de nanopartículas aceitáveis em temperatura ambiente, seguido por um aumento expressivo daquela variável na maior temperatura (40°C). Assim, pode-se dizer que no quesito tamanho os produtos se mantêm adequados para uso por, no mínimo, 3 meses. Contudo, para que a validade seja estendida, faz-se necessária a adição de conservantes.

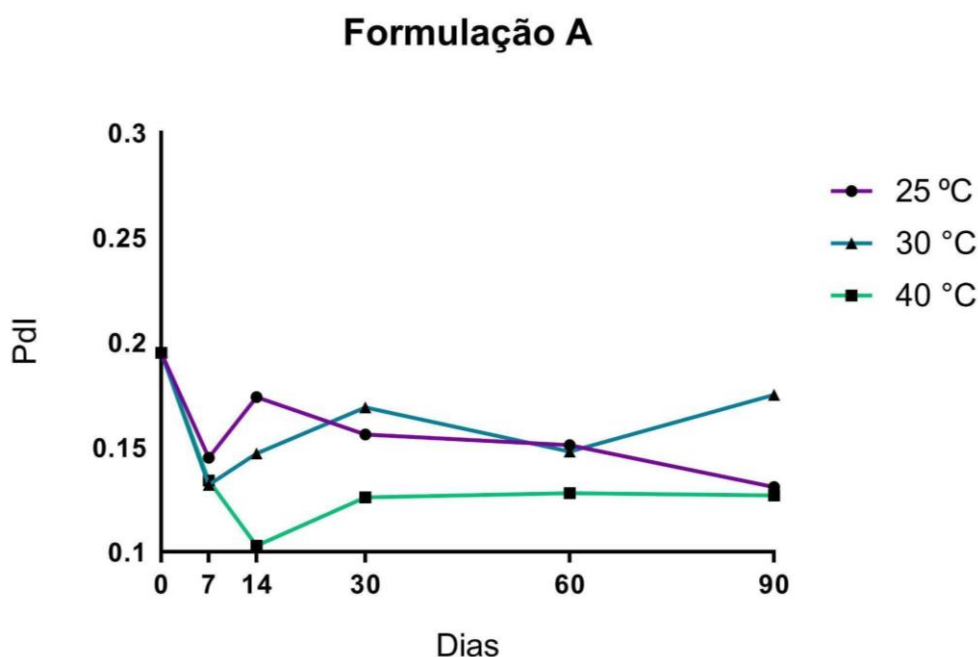
Os valores de PDI também foram determinados e os resultados são mostrados na tabela 13 e ilustrados nas figuras 36 e 37.

**Tabela 13:** Valores médios de PDI das nanoformulações em relação à temperatura e tempo de incubação.

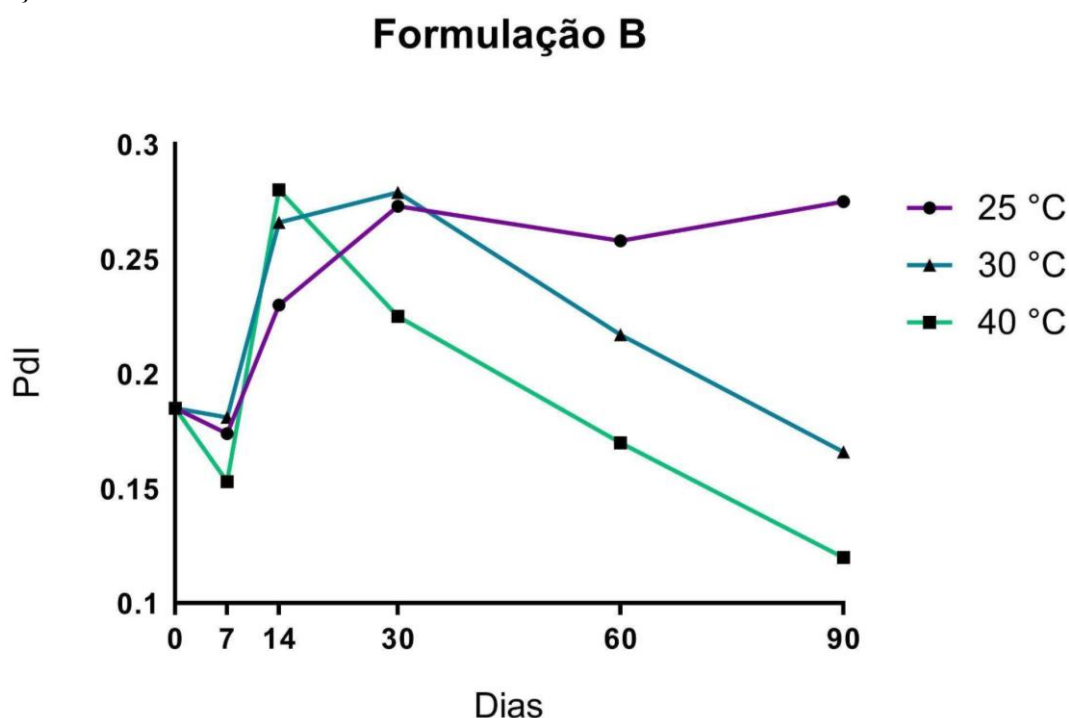
Dia	Formulação A			Formulação B		
	25°C	30°C	40°C	25°C	30°C	40°C
0		0,195 ± 0,04			0,185 ± 0,03	
7	0,145 ± 0,02	0,132 ± 0,00	0,134 ± 0,01	0,174 ± 0,04	0,181 ± 0,01	0,153 ± 0,02
14	0,174 ± 0,03	0,147 ± 0,02	0,103 ± 0,02	0,230 ± 0,05	0,266 ± 0,00	0,280 ± 0,02
30	0,156 ± 0,01	0,169 ± 0,01	0,126 ± 0,02	0,273 ± 0,01	0,279 ± 0,01	0,225 ± 0,02
60	0,151 ± 0,02	0,148 ± 0,04	0,128 ± 0,02	0,258 ± 0,02	0,217 ± 0,01	0,170 ± 0,08
90	0,131 ± 0,03	0,175 ± 0,01	0,127 ± 0,00	0,275 ± 0,00	0,166 ± 0,03	0,120 ± 0,01

**Legenda:** Valores expressos em média ± desvio padrão.

**Figura 36:** Valores médios de PDI da nanoformulação A em relação à temperatura e tempo de incubação.



**Figura 37:** Valores médios de PDI da nanoformulação B em relação à temperatura e tempo de incubação.



De modo geral, a formulação A apresentou variações menores de PDI comparativamente à formulação B ao longo do tempo, o que possivelmente pode estar relacionado aos componentes extras da segunda formulação (i.e., quercetina e PEG 400). Na primeira semana, ambas as formulações apresentaram uma diminuição de PDI nas temperaturas analisadas, o que pode estar associado a um período de adequação do sistema às condições ambientais. No 14º dia de armazenamento, o PDI da formulação A aumentou à 25°C e 30°C, enquanto à 40°C o efeito inverso foi observado. De outra forma, a formulação B apresentou aumentos mais expressivos de PDI em todas as temperaturas, alcançando a faixa de 0,2. Ao longo do período de armazenamento estudado, a formulação A manteve-se estável, apresentando baixas variações de PDI, dentro da faixa de 0,1 nas três condições térmicas. Todavia, os valores de PDI da formulação B mostraram-se estáveis à 25°C, enquanto uma redução considerável foi detectada à 30°C e 40°C.

Em seu conjunto, os valores de PDI das nanoformulações permaneceram abaixo do limite de 0,3, indicando que os sistemas são adequados ao uso pretendido. Resultados semelhantes foram descritos em estudos com nanoemulsões de quercetina, onde valores de PDI abaixo de 0,3 e 0,2 sob diferentes temperaturas de armazenamento foram observados (MAHADEV et al., 2022; VAZ et al., 2020). Porém, os dados do presente estudo devem ser

corroborados com os demais resultados obtidos na caracterização das nanoformulações, pois apesar dos baixos valores de PDI estarem associados a uma maior monodispersão, isso não necessariamente significa que o sistema está de acordo com o esperado.

A análise dos dados obtidos a partir do 30° dia de armazenamento revelou que a formulação B apresentou uma tendência à diminuição do PDI nas maiores temperaturas, enquanto que o tamanho das nanopartículas alcançou 200 nm. Isso significa que a maior homogeneidade do sistema pode estar vinculada ao aumento de tamanho das nanopartículas por eventos de coalescência, gerando populações mais monodispersas, porém inadequadas. Por sua vez, a formulação A apresentou comportamento distinto, pois apesar do maior tamanho das nanopartículas, os valores de PDI mantiveram-se estáveis, indicando que estes resultados estão vinculados às diferenças de componentes entre as formulações. Assim, de modo geral, ambas as formulações apresentaram resultados positivos de PDI e se mostraram adequadas para utilização pretendida por um período de, no mínimo, 3 meses.

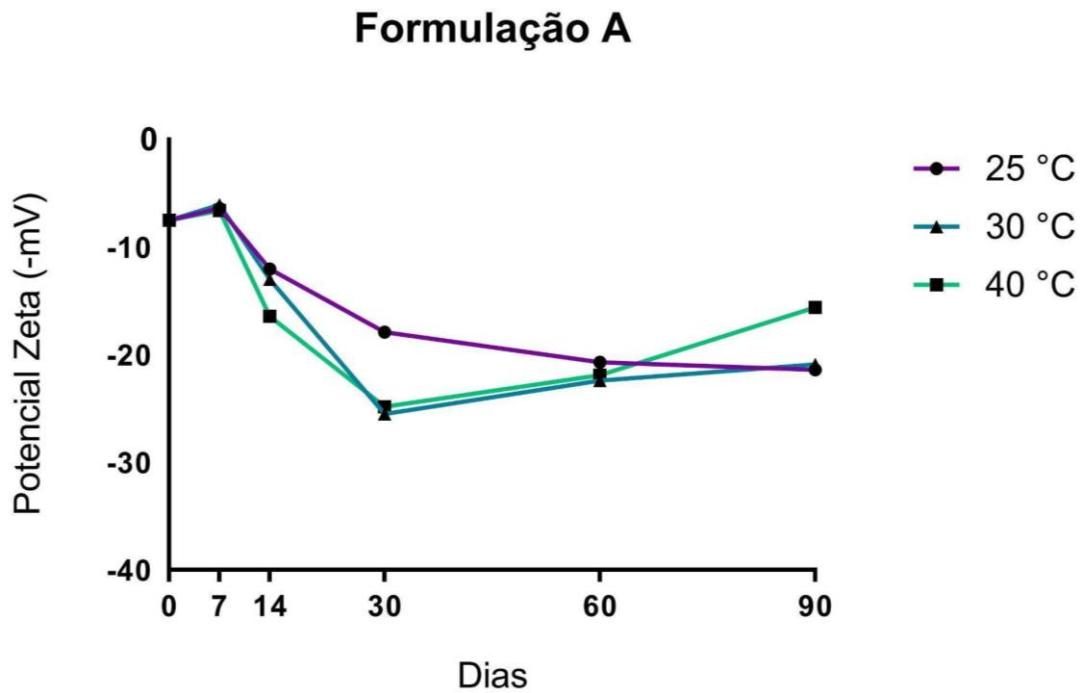
Os resultados de potencial zeta das nanoformulações A e B são apresentados na tabela 14 e ilustrados nas figuras 38 e 39.

**Tabela 14:** Potencial zeta das nanoformulações A e B em relação à temperatura e tempo de incubação.

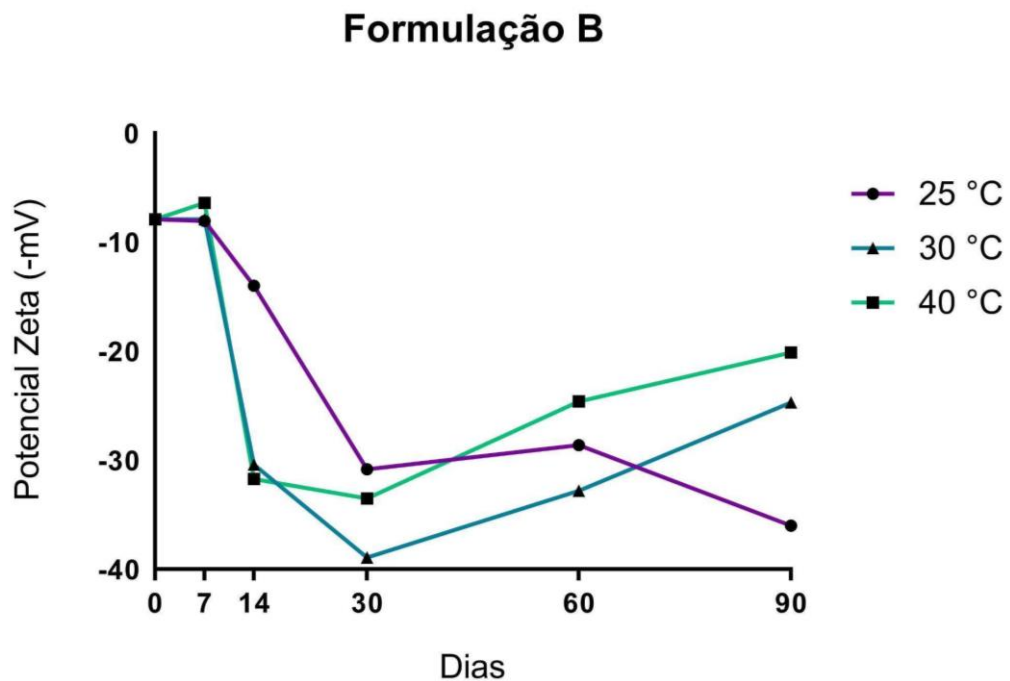
Dia	Formulação A			Formulação B		
	25°C	30°C	40°C	25°C	30°C	40°C
0		-7,4 ± 0,8			-7,9 ± 0,4	
7	-6,3 ± 0,8	-6,0 ± 0,9	-6,6 ± 0,8	-8,0 ± 1,3	-7,9 ± 0,3	-6,3 ± 1,4
14	-12,0 ± 2,0	-13,0 ± 0,8	-16,4 ± 4,2	-14,0 ± 3,9	-30,4 ± 1,1	-31,7 ± 2,3
30	-17,9 ± 2,2	-25,5 ± 1,6	-24,8 ± 2,1	-30,8 ± 3,8	-38,9 ± 3,4	-33,5 ± 3,4
60	-20,7 ± 0,4	-22,4 ± 3,5	-21,9 ± 1,9	-28,6 ± 5,9	-32,8 ± 0,2	-24,6 ± 0,5
90	-21,4 ± 6,7	-20,9 ± 8,4	-15,6 ± 4,0	-36,0 ± 1,9	-24,7 ± 3,0	-20,1 ± 1,6

**Legenda:** Valores expressos em média ± desvio padrão.

**Figura 38:** Potencial zeta da nanoformulação A em relação à temperatura e tempo de incubação.



**Figura 39:** Potencial zeta da nanoformulação B em relação à temperatura e tempo de incubação.



De modo geral, a formulação B apresentou valores maiores em módulo de potencial zeta em relação à formulação A, o que possivelmente está relacionado à presença de quercetina e ι-carragenana, resultando no aumento das cargas negativas do sistema nanoestruturado. Já em

relação ao período de incubação, inicialmente o potencial zeta das formulações se mostrou semelhante, permanecendo em torno de -7,0 mV. Na primeira semana, pequenas variações foram detectadas, porém, a partir do 14º dia até o final do primeiro mês, um aumento expressivo dos valores em módulo foi detectado, situando-se próximo de -30,0 mV. Ao final do segundo e terceiro meses, as formulações apresentaram valores considerados estáveis de potencial zeta à 25°C, enquanto que à 30°C e 40°C os sistemas apresentaram diminuições proporcionais às temperaturas. Resultados semelhantes foram registrados por Vaz et al. (2020) com nanoemulsões de quercetina, com valores de potencial zeta entre -20 mV a -40 mV ao longo do tempo de incubação. Os autores relacionaram este aumento à hidrólise dos fosfolipídios que compõem o sistema, fato que também deve ter contribuído para os resultados do presente estudo. Já em nanoemulsões de mucina revestidas por  $\lambda$ - e  $\kappa$ - carragenanas, Celli et al. (2019) constataram que quanto maior a concentração dos polissacarídeos, mais negativo é o potencial zeta, o que está vinculado ao aumento na densidade das cargas negativas decorrente da presença de grupos sulfatos naquelas macromoléculas.

Valores de potencial zeta próximos ou maiores que  $\pm 30$  mV geralmente são considerados bons indicadores de estabilidade dos produtos nanoestruturados (TRAN *et al.*, 2014; FARDOUS *et al.*, 2021). Contudo, da mesma forma como observado aos resultados de PDI, é necessário olhar para as características do sistema como um todo. A partir do 60º dia detectou-se a tendência à diminuição das cargas negativas no sistema de modo proporcional à temperatura. Esse comportamento ocorre em conjunto com o aumento de tamanho das nanopartículas e diminuição do PDI, podendo indicar uma futura desestabilização. Porém, à 25°C as nanoformulações mantiveram-se dentro dos parâmetros aceitáveis, o que garante a integridade dos produtos por, no mínimo, 3 meses. Assim, em resumo, os valores médios de potencial zeta se mostraram adequados à integridade dos produtos, ficando em torno de -20,0 mV e -30,0 mV ao final do ensaio.

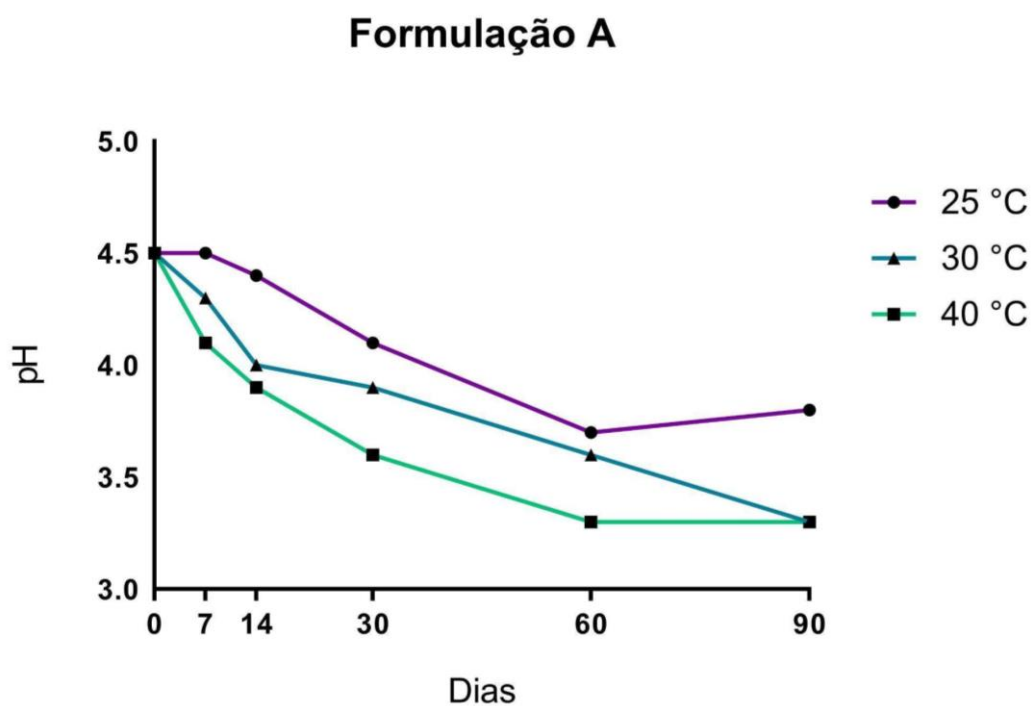
Os resultados referentes ao pH das formulações são mostrados na tabela 15 e ilustrados nas figuras 40 e 41.

**Tabela 15:** pH das nanoformulações A e B em relação à temperatura e tempo de incubação.

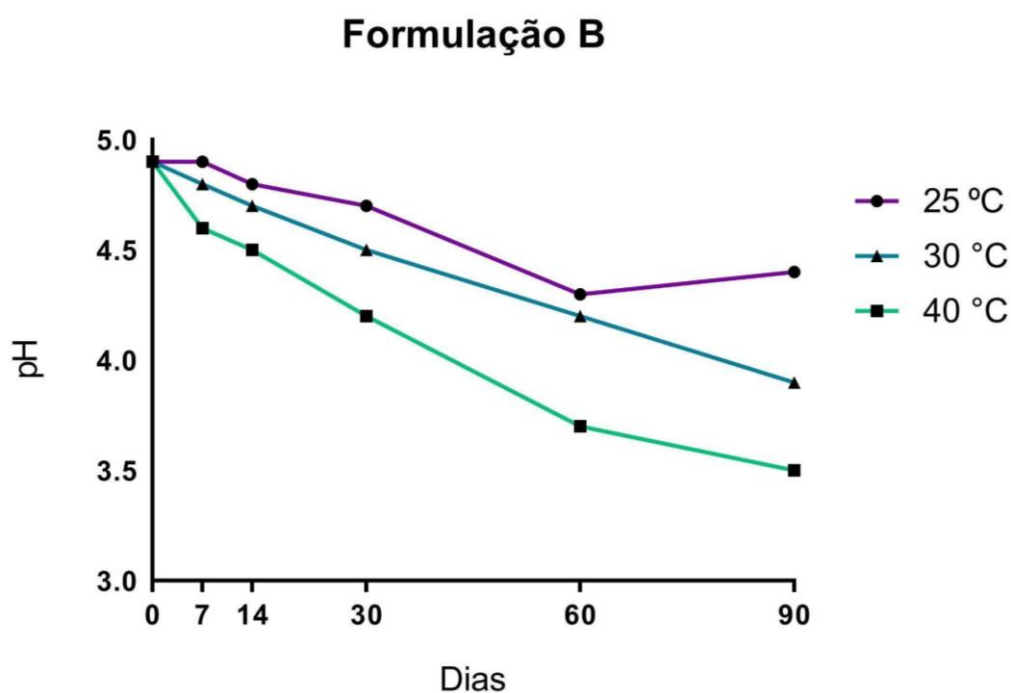
Dia	Formulação A			Formulação B		
	25°C	30°C	40°C	25°C	30°C	40°C
0		4,5 ± 0,3			4,9 ± 0,0	
7	4,5 ± 0,3	4,3 ± 0,2	4,1 ± 0,1	4,9 ± 0,0	4,7 ± 0,0	4,6 ± 0,0
14	4,4 ± 0,2	4,0 ± 0,1	3,9 ± 0,1	4,8 ± 0,0	4,7 ± 0,0	4,5 ± 0,1
30	4,1 ± 0,1	3,9 ± 0,0	3,6 ± 0,0	4,7 ± 0,0	4,5 ± 0,0	4,2 ± 0,0
60	3,7 ± 0,0	3,6 ± 0,0	3,3 ± 0,0	4,3 ± 0,1	4,2 ± 0,1	3,7 ± 0,1
90	3,8 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1	4,4 ± 0,1	3,9 ± 0,1	3,5 ± 0,1

**Legenda:** Valores expressos em média ± desvio padrão.

**Figura 40:** Valores de potencial hidrogeniônico da nanoformulação A em relação à temperatura e tempo de incubação.



**Figura 41:** Valores de pH da nanoformulação B em relação à temperatura e tempo de incubação.

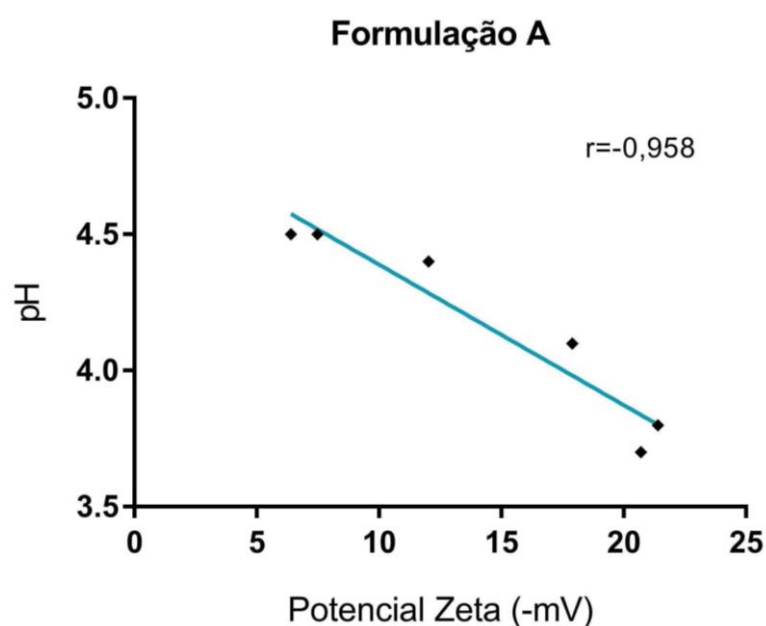


A formulação B apresentou valores de pH maiores em relação à formulação A, o que pode estar relacionado à presença de quercetina no sistema. Além disso, ao longo dos três meses de ensaio, foi possível notar uma diminuição de pH proporcional às temperaturas de incubação em ambas as formulações, com maiores reduções à 40°C, intermediárias à 30°C e menores à 25°C. Dentre os fatores de maior influência em sistemas emulsionáveis, o pH e a temperatura de armazenamento têm recebido especial atenção. Em geral, temperaturas mais altas impulsionam fenômenos de desestabilização, enquanto condições mais brandas melhoram a estabilidade das nanoemulsões (KARTHIK *et al.*, 2015). Já os efeitos do pH podem ser visualizados nas demais características físico-químicas das nanopartículas, como tamanho e potencial zeta, uma vez que o potencial hidrogeniônico do meio influencia diretamente na dinâmica das cargas dos sistemas. Além disso, há uma série de métodos de emulsificação e inversão de fases pH-dependentes, os quais direcionam e determinam o comportamento das nanoemulsões de acordo com o pH, dado o seu impacto sobre este tipo de sistema (WANG *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2021).

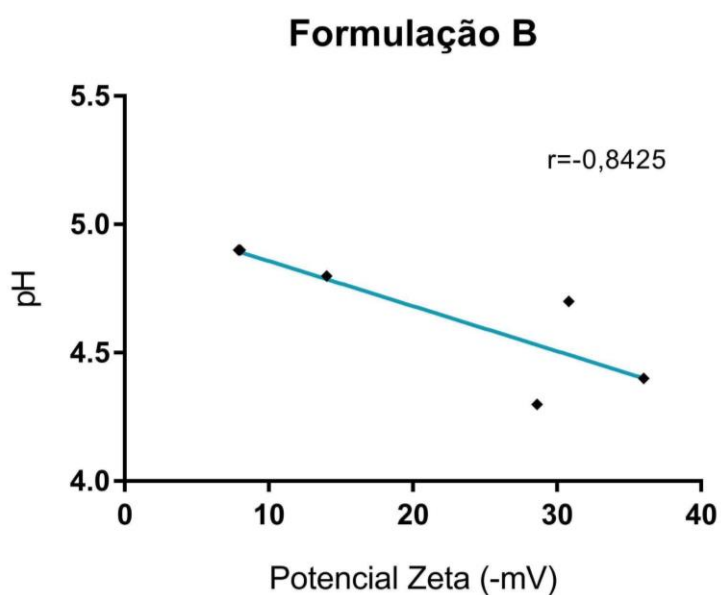
No presente estudo, a identificação de uma relação proporcional entre as temperaturas de armazenamento e o pH ilustra os caminhos pelos quais a desestabilização desses sistemas ocorre e, neste caso, a composição dos produtos é um fator determinante. Porém, cabe ressaltar que todas as características físico-químicas das formulações se relacionam entre si, de modo

que algumas exercem maiores efeitos sobre as outras, resultando em um comportamento único e característico para cada nanosistema em questão. Assim, a fim de avaliar quais variáveis das formulações estavam mais inter-relacionadas, análises de correlação de Pearson foram realizadas. A correlação mais significativa identificada foi entre o pH e o potencial zeta em ambas as formulações, quando incubadas à 25°C. Os resultados são mostrados nas figuras 42 e 43.

**Figura 42:** Correlação negativa entre os potenciais hidrogeniônico e zeta da nanoformulação A à 25°C.



**Figura 43:** Correlação negativa entre pH e potencial zeta da nanoformulação B à 25°C.





A partir dos resultados obtidos foi possível inferir que quanto menor o pH, maior o potencial zeta e vice-versa dos sistemas nanoestruturados em análise. O potencial zeta é variável dependente do pH e da condutividade das dispersões e, portanto, uma vez que esta variável mede as interações eletrostáticas entre as nanopartículas, o aumento de íons hidrônio nas formulações afeta diretamente os valores de sua medida (CLOGSTON & PATRI, 2010). No presente estudo, a formulação A (sem quercetina e com  $\iota$ -carragenana) alcançou valores próximos a -20,0 mV, enquanto a formulação B (com quercetina e  $\iota$ -carragenana) atingiu -36,0 mV. Resultados semelhantes foram observados por Son et al. (2019) com nanoemulsões de quercetina, onde valores de -22,1 mV a -45,8 mV em pH ácidos (4,0-5,5) foram detectados. Neste caso, porém, as nanoemulsões apresentaram valores de potencial zeta maiores com o aumento do pH, o que está relacionado aos demais componentes das formulações. Por sua vez, Gu et al. (2004) observaram resultados contrários aos do presente estudo com emulsões de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\iota$ -carragenana, as quais evidenciaram potenciais zeta positivos em pH baixos e negativos em pH altos. Os autores relacionaram o fenômeno às interações fracas entre o polissacarídeo e a proteína, vinculadas à protonação dos grupos sulfatos da carragenana em pH baixo, uma vez que o pKa desses grupamentos é em torno de 2. Porém, novamente é possível observar a influência que os componentes da formulação exercem sobre o comportamento do sistema, fazendo com que cada cenário seja único.

Na formulação A também foi identificada uma correlação negativa entre pH e tamanho das nanopartículas à 30°C. Este resultado possivelmente está vinculado ao aumento dos íons hidrônio à medida que o sistema acidifica, os quais se ligam às cargas negativas dos grupos sulfatos do revestimento polissacarídico e, assim, diminuem a repulsão entre as nanopartículas, promovendo a coalescência e o aumento de tamanho. Já a formulação B apresentou correlações positivas entre PDI e tamanho das nanopartículas à 25°C e 30°C e entre PDI e potencial zeta à 25°C. Tais efeitos vinculam-se à diminuição da uniformidade das populações de nanopartículas à medida que ocorrem eventos de coalescência, uma vez que ao longo do tempo a formulação B também apresentou diminuição de pH, de modo que a elevação de íons hidrônio no meio contribuiu à anulação das cargas negativas dos grupamentos sulfato da carragenana e diminuiu a repulsão entre as nanopartículas. Como resultado, populações de nanopartículas com tamanhos diversos foram geradas, levando à redução da uniformidade das mesmas e ao aumento do PDI.

Resultados semelhantes foram registrados por Son et al. (2019) em nanoemulsões de quercetina. Os autores verificaram que o pH não exerceu efeitos diretos sobre o tamanho das

nanopartículas, apenas sobre o PDI e potencial zeta. Tal resultado é interessante porque, no presente estudo, a formulação A (sem quercetina, apenas carragenana) apresentou correlação significativa entre pH e tamanho das nanopartículas, enquanto a formulação B (com quercetina e carragenana) evidenciou correlações apenas entre os demais parâmetros, o que novamente indica que a composição das formulações é fator determinante para o comportamento do sistema nanoestruturado. Contudo, apesar de não possuir um efeito direto na segunda formulação, o pH é uma variável que impacta as demais características físico-químicas do sistema e sua influência na estabilidade deste é identificada de forma indireta.

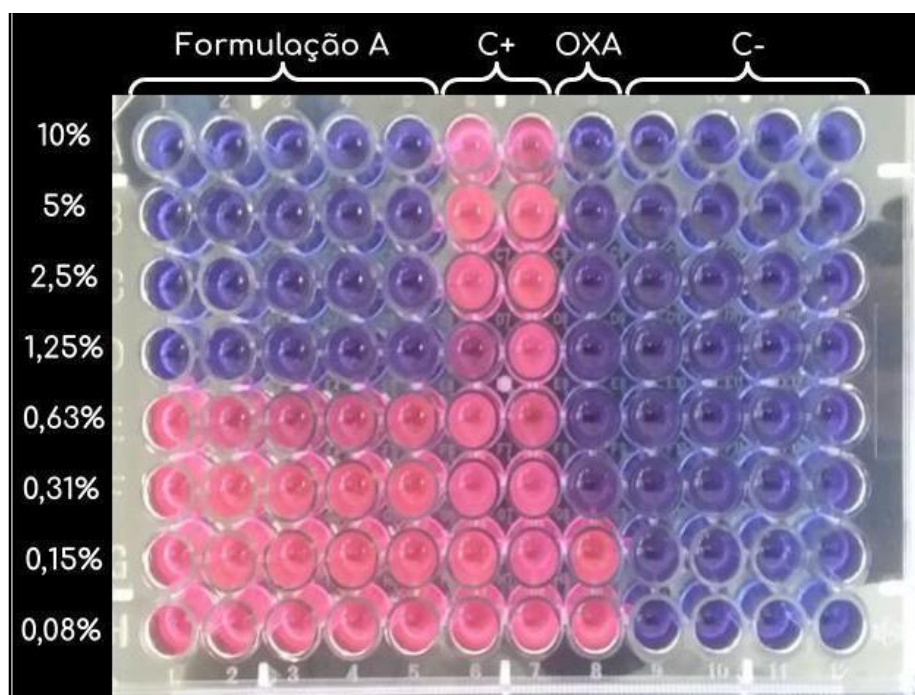
A incubação das nanoformulações nas temperaturas de 25°C, 30°C e 40°C objetivou submeter os sistemas nanoestruturados a níveis crescentes de energia para que, assim, a desestabilização seja acelerada, simulando o efeito do tempo a longo prazo. Esse tipo de ensaio pode ser utilizado para definir, por exemplo, a validade das formulações e/ou a necessidade de incorporação de outros componentes. Neste cenário, a temperatura de 25°C simula as condições ambientais em que o produto será exposto na indústria, enquanto as temperaturas de 30°C e 40°C têm como principal objetivo estimular a desestabilização. Assim, no presente estudo, ao considerar os resultados obtidos à 25°C, constatou-se que ambas as formulações se mantiveram estáveis e possuem, no mínimo, 3 meses de validade. Porém, para que este prazo seja estendido, se faz necessária a adição de compostos conservantes.

## **5.2 Avaliação da eficácia e ensaios *in vitro***

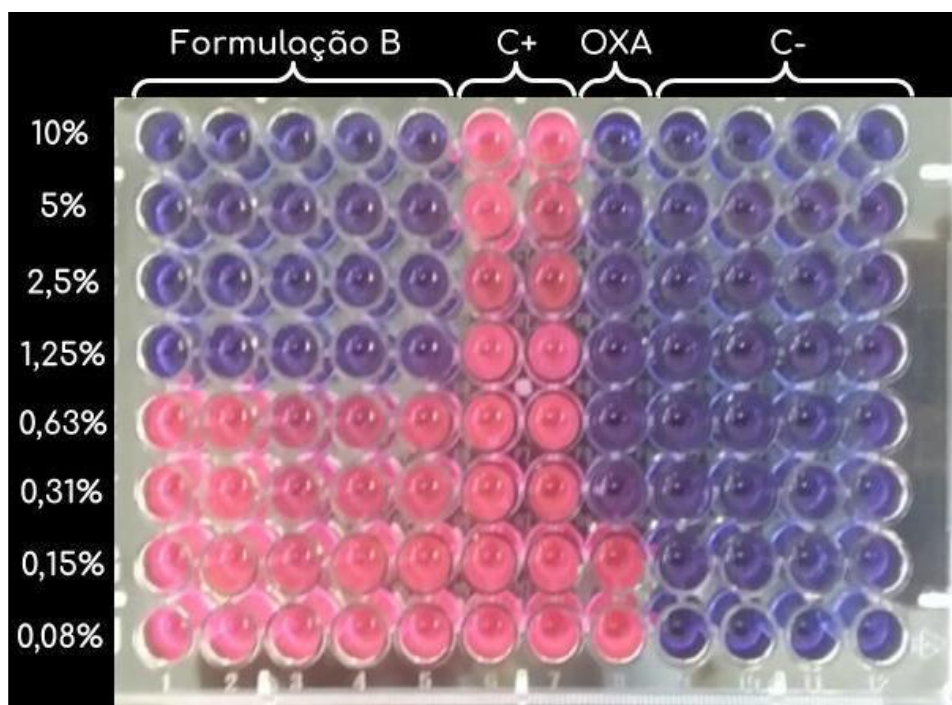
### **5.2.1 Teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC)**

Para determinar a ação antisséptica dos produtos, a atividade bactericida das formulações foi avaliada através do teste de MIC para a espécie *Staphylococcus aureus*, a qual está associada a uma série de doenças infecciosas (XIAO *et al.*, 2020). Os resultados são apresentados pelas figuras 44 e 45.

**Figura 44:** Detalhe visual do ensaio de concentração inibitória mínima da nanoformulação A, indicando MIC de 1,25%. C+: Controle positivo; OXA: Oxacilina; C-: Controle negativo.



**Figura 45:** Detalhe visual do ensaio de concentração inibitória mínima da nanoformulação B, indicando MIC de 1,25%. C+: Controle positivo; OXA: Oxacilina; C-: Controle negativo.



A partir das imagens, é possível constatar que ambas as formulações apresentaram o mesmo valor de MIC, i.e., 1,25%. Esse efeito está diretamente relacionado à presença dos bioativos nas formulações. Como relatado anteriormente, a quercetina é conhecida por suas propriedades antimicrobianas, como demonstrado contra *S. aureus* (BADHWAR *et al.*, 2021; CHITTASUPHO *et al.*, 2022; GÜRAN *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2019; PAL & TRIPATHI, 2019; TRAN *et al.*, 2019).

O óleo essencial de melaleuca também exerce uma potente atividade bactericida contra *S. aureus*. Xiao *et al.* (2020) constataram que o composto inibe o crescimento bacteriano na concentração de 0,5%, enquanto Falci *et al.* (2015) obtiveram resultados semelhantes com 0,1% e 0,2%. Já Brun *et al.* (2018) avaliaram o efeito daquele óleo sob cepas de MRSA e verificaram que o composto inibe o crescimento bacteriano na faixa de 0,75% a 2,5%. Por conta de sua alta hidrofobicidade, o óleo essencial de melaleuca causa o rompimento de estruturas membranares das células bacterianas, aumentando a permeabilidade e reduzindo a seletividade das mesmas (COX *et al.*, 2000; FALCI *et al.*, 2015). Alguns estudos vinculam esse efeito às moléculas que compõem a matriz do óleo, como eucaliptol, limoneno e  $\alpha$ -pineno, porém a atividade bactericida é resultante de efeitos sinérgicos entre estes monoterpenos e não devido à ação de uma molécula isoladamente (FALCI *et al.*, 2015; MANTIL *et al.*, 2015; BULDAIN *et al.*, 2021). Diversos autores também têm demonstrado a utilização do óleo essencial de melaleuca como agente antisséptico e cicatrizante para uso tópico, o qual, além dos efeitos bactericidas, também promove a hidratação da pele e apresenta uma maior adesão dos pacientes ao tratamento (DE ASSIS *et al.*, 2020; GNATTA *et al.*, 2021; YOUN *et al.*, 2021).

Em relação à  $\iota$ -carragenana, até o momento não há trabalhos que demonstrem a ação direta do ativo sobre células bacterianas, porém, em um estudo realizado por Souza *et al.* (2018), os autores avaliaram a atividade bactericida de polissacarídeos sulfatados extraídos de algas vermelhas e registraram uma alta inibição no crescimento de *S. aureus*. A hipótese é que este efeito pode estar vinculado à ligação dos polissacarídeos à receptores da parede celular, membrana citoplasmática e material genético das bactérias, o que resulta no aumento da permeabilidade, perda de conteúdo intracelular e ligação ao DNA microbiano (SHANNON & ABU-GHANNAM, 2016; SOUZA *et al.*, 2018). Além disso,  $\iota$ -carragenana tem sido avaliada como revestimento para materiais com atividade bactericida e/ou bacteriostática na prática médica, tais como curativos, algodões e géis cicatrizantes, aumentando, assim, a performance biológica e reduzindo a possibilidade de infecções bacterianas (NORALIAN *et al.*, 2021; RUFATO *et al.*, 2021). Por fim, outro fato interessante é que o PEG 400 também pode contribuir com a atividade bactericida do produto. O efeito do solvente está vinculado à uma

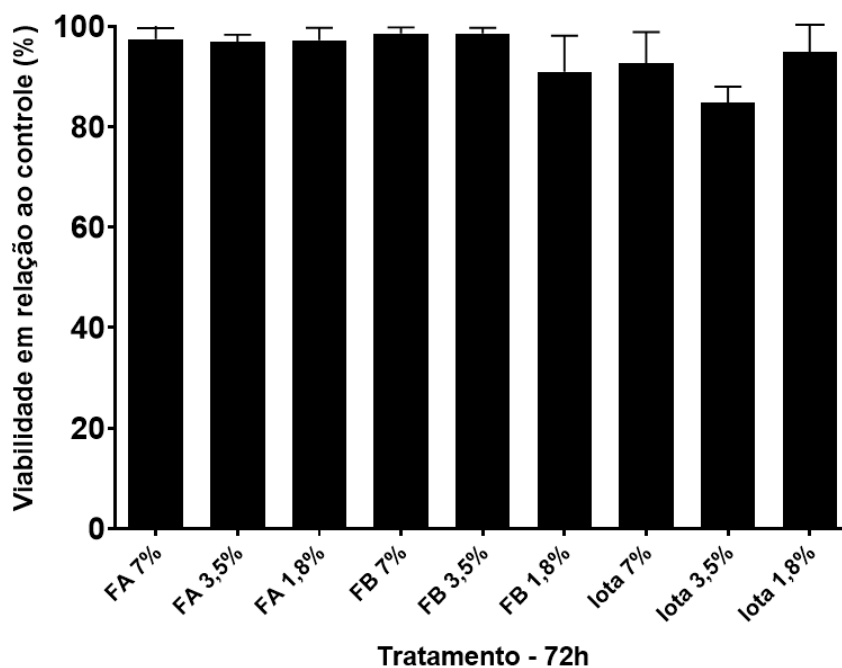
redução na atividade de água do sistema, o que resulta num estresse adicional que torna os microrganismos mais suscetíveis a danos em suas membranas celulares (MANTIL *et al.*, 2015).

No presente estudo, as nanoformulações A e B apresentaram MIC de 1,25%, indicando que o componente de maior atividade bactericida é o óleo essencial de melaleuca presente em ambas as formulações. Porém, uma vez que a segunda formulação possui maior quantidade de ativos bactericidas do que a primeira (quercetina e PEG 400), os valores iguais podem indicar uma limitação metodológica. Após a concentração de 1,25%, o teste segue para 0,63%, reduzindo pela metade o intervalo de detecção. Assim, para identificar a diferença entre as formulações, novos testes devem ser realizados entre as faixas de 0,63-1,25%.

### 5.2.2 Ensaio de citotoxicidade e atividade contra o SARS-CoV-2

O ensaio de citotoxicidade foi conduzido a fim de determinar a compatibilidade biológica e/ou segurança dos produtos frente à cultura celular, verificando, assim, a capacidade dos mesmos de causarem lesões, danos ou até mesmo morte celular. Esta avaliação é importante para assegurar que a atividade antiviral de um produto, avaliada através de um sistema celular, não seja decorrente da perda de viabilidade celular. Os resultados são indicados pela figura 46.

**Figura 46:** Valores médios de viabilidade celular de diferentes concentrações dos produtos.

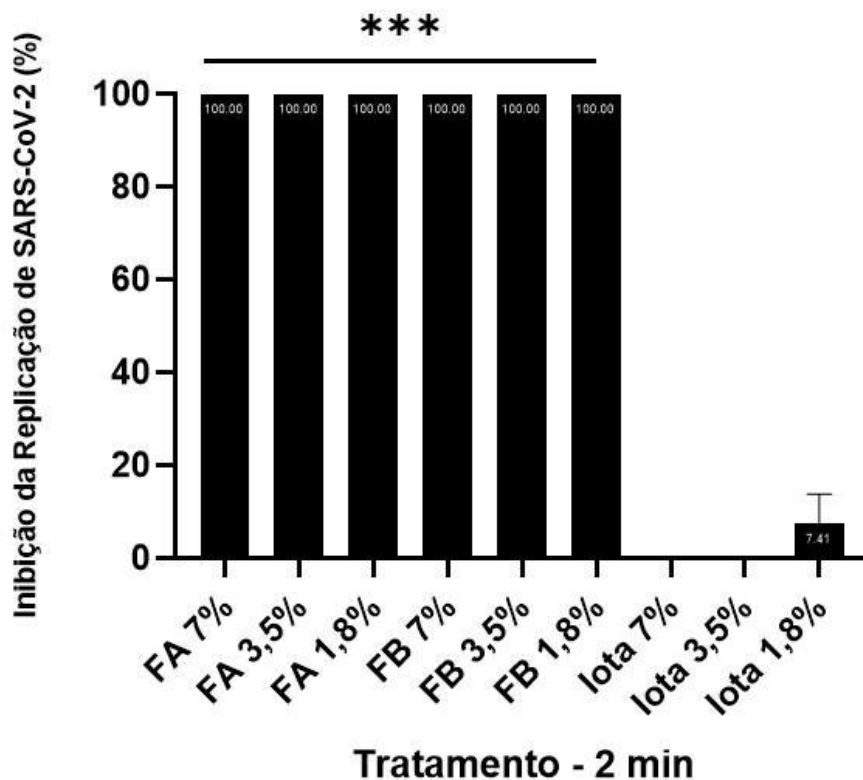


**Legenda:** Os dados são apresentados em médias com marcadores de desvio padrão.

A partir deste dado é possível observar que tanto FA quanto FB e o controle com a iota carragenana não promoveram perda de viabilidade celular nas três concentrações avaliadas. A solução de ι-carragenana foi submetida ao teste nas mesmas concentrações para fins comparativos entre os sistemas nanoestruturados e o ativo livre. Todos os tratamentos apresentaram alta viabilidade em todas as concentrações testadas, com os nanoproductos tendendo a serem ainda menos tóxicos que o polissacarídeo.

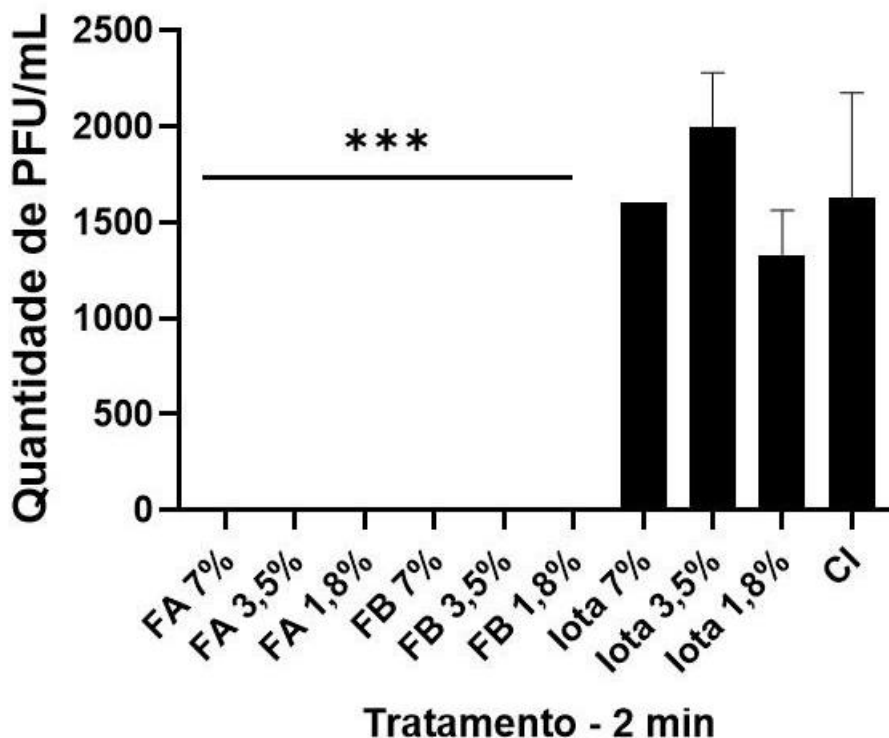
Já em relação à atividade virucida, 10<sup>5</sup> PFU de SARS-CoV-2 foram expostas aos produtos FA, FB e à solução 0,6% de ι-carragenana em diferentes concentrações por 2 e 10 minutos e depois submetidos à cultura celular para que, assim, fosse possível avaliar o potencial de inativação viral dos compostos. Os resultados referentes à inibição da replicação viral no tratamento de 2 minutos são indicados pelas figuras 47 (porcentagem de inibição) e 48 (contagem de PFUs).

**Figura 47:** Valores médios da porcentagem de inibição da replicação de SARS-CoV-2 por FA, FB e solução 0,6% de ι-carragenana em diferentes concentrações no tratamento de 2 minutos.



**Legenda:** Os dados são apresentados em médias com marcadores de desvio padrão; sendo \*\*\*  $p \leq 0,001$  em relação ao controle.

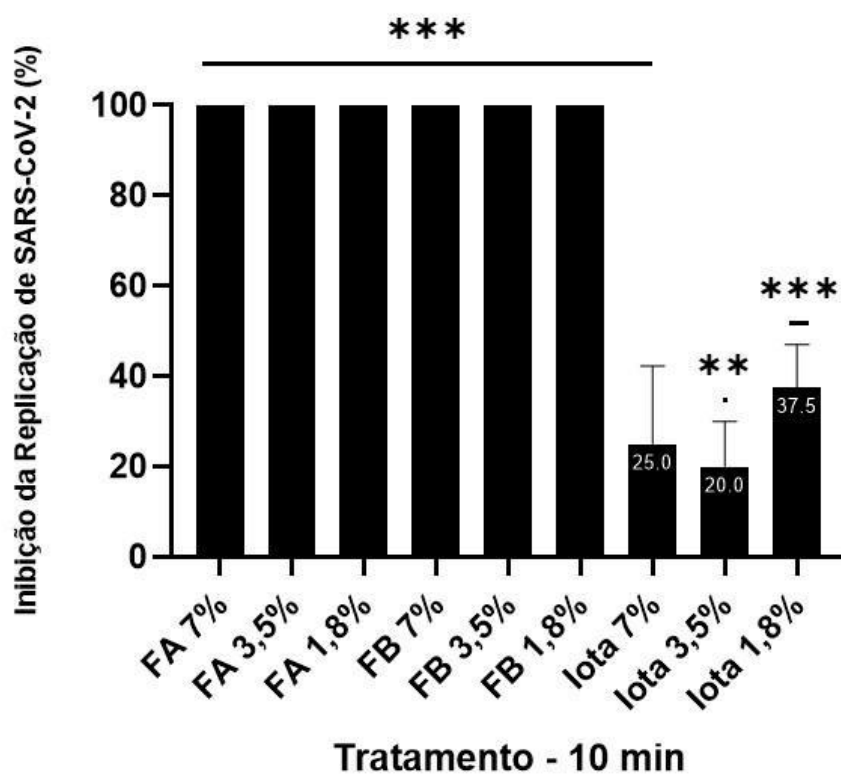
**Figura 48:** Valores médios de PFU/mL de SARS-CoV-2 apresentados por FA, FB e solução 0,6% de  $\iota$ -carragenana em diferentes concentrações no tratamento de 2 minutos.



**Legenda:** Os dados são apresentados em médias com marcadores de desvio padrão; sendo \*\*\*  $p \leq 0,001$  em relação ao grupo controle (sem tratamento).

A partir dos resultados é possível observar que, no tratamento de 2 minutos, os nanoprodutos FA e FB impediram completamente a replicação viral nas três concentrações avaliadas, diferentemente da solução com 0,6% de  $\iota$ -carragenana, a qual não apresentou valores médios significativos de inibição. O mesmo pode ser observado no resultado complementar da contagem de PFU no segundo gráfico, o qual indica que as formulações FA e FB não apresentaram unidades formadoras de placa, enquanto a solução 0,6% de  $\iota$ -carragenana apresentou quantidades semelhantes ao grupo controle (sem tratamento, com infecção). Já os resultados referentes ao tratamento de 10 minutos são indicados pelas figuras 49 (porcentagem de inibição) e 50 (contagem de PFUs).

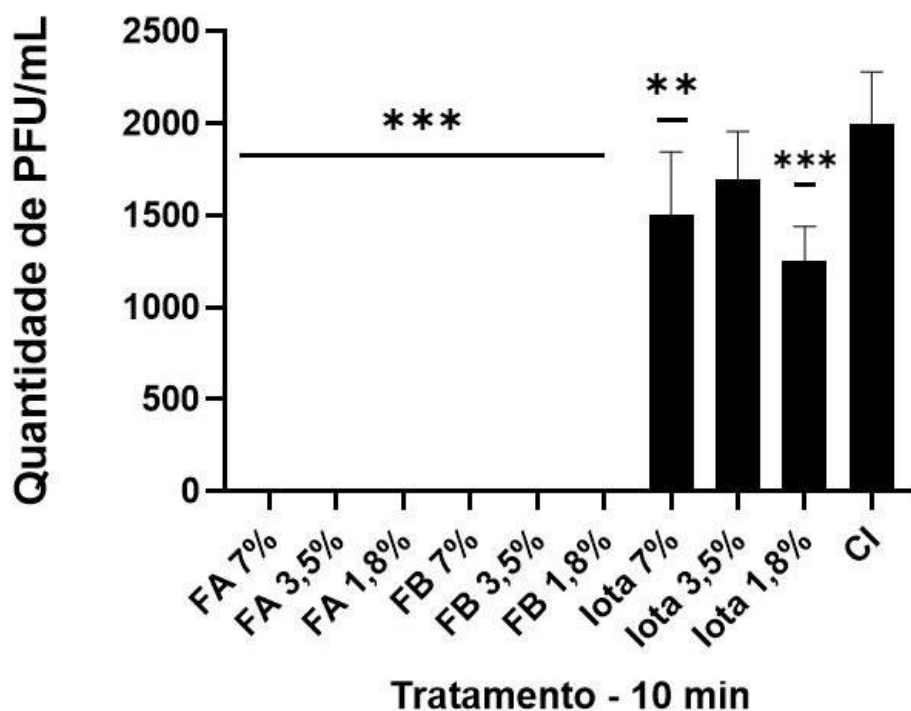
**Figura 49:** Valores médios da porcentagem de inibição da replicação de SARS-CoV-2 por FA, FB e solução 0,6% de ι-carragenana em diferentes concentrações no tratamento de 10 minutos.



**Legenda:** Os dados são apresentados em médias com marcadores de desvio padrão; sendo \*\*\*  $p \leq 0,001$  e \*\*  $p \leq 0,01$  em relação ao controle.



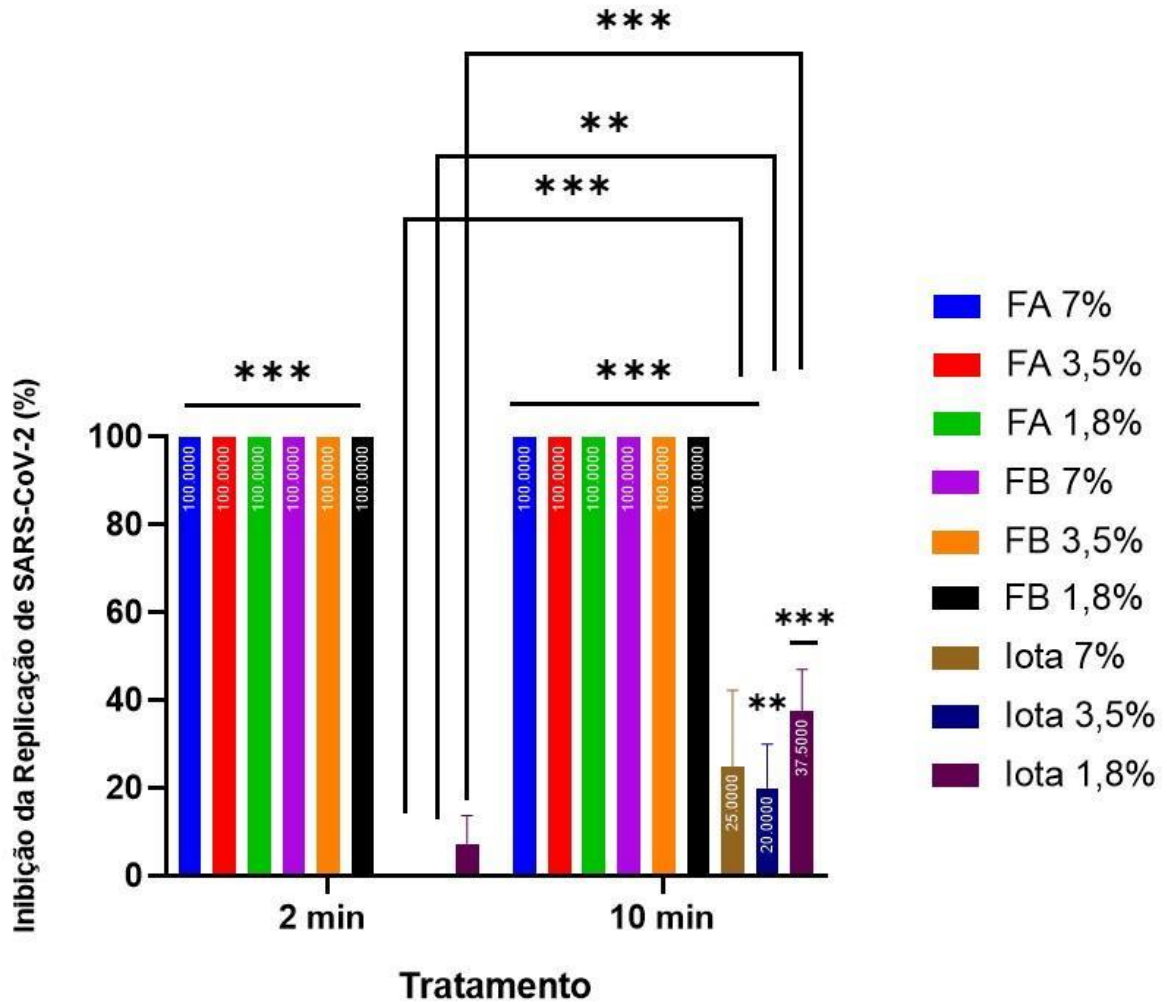
**Figura 50:** Valores médios de PFU/mL de SARS-CoV-2 apresentados por FA, FB e solução 0,6% de ι-carragenana em diferentes concentrações no tratamento de 10 minutos.



**Legenda:** Os dados são apresentados em médias com marcadores de desvio padrão; sendo \*\*\*  $p \leq 0,001$  e \*\*  $p \leq 0,01$  em relação ao grupo controle (sem tratamento).

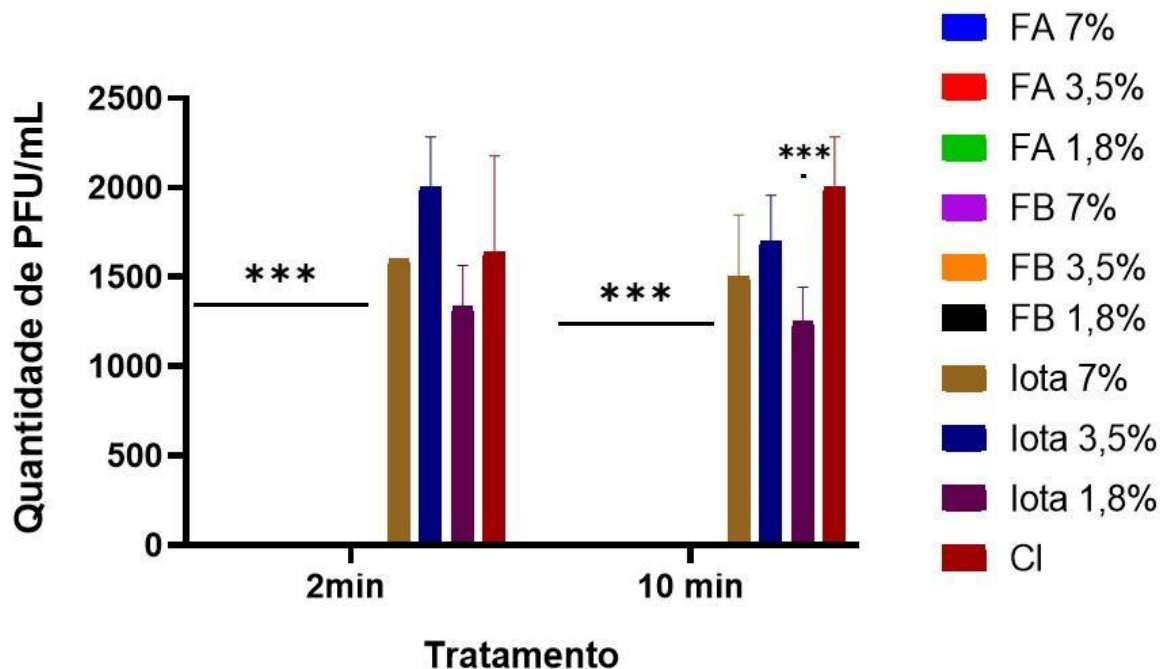
Já em relação ao tratamento de 10 minutos é possível observar que as formulações FA e FB continuaram apresentando inibição completa da replicação viral, enquanto que a solução 0,6% de ι-carragenana passou a apresentar em torno de 20-40% de inibição, o que indica que a atividade virucida do polissacarídeo está relacionada ao tempo de contato com a cepa viral. O mesmo é observado no gráfico de quantidade de PFU/mL, em que FA e FB não apresentaram unidades formadoras de placa e a solução 0,6% de ι-carragenana apresentou uma quantidade menor em relação ao grupo controle quando comparado ao tratamento de 2 minutos. Para melhor visualização, as comparações entre os tempos de tratamento são indicados pelas figuras 51 (porcentagem de inibição) e 52 (contagem de PFUs).

**Figura 51:** Comparação entre os valores médios de inibição da replicação viral apresentados por FA, FB e solução 0,6% de ι-carragenana em diferentes concentrações e nos tratamentos de 2 e 10 minutos de contato.



**Legenda:** Os dados são apresentados em médias com marcadores de desvio padrão; sendo \*\*\*  $p \leq 0,001$  e \*\*  $p \leq 0,01$  entre os tratamentos em tempos diferentes.

**Figura 52:** Comparação entre os valores médios de quantidade PFU/mL apresentados por FA, FB e solução 0,6% de ι-carragenana em diferentes concentrações e nos tratamentos de 2 e 10 minutos de contato em relação ao grupo controle de cada tempo.



**Legenda:** Os dados são apresentados em médias com marcadores de desvio padrão; sendo \*\*\*  $p \leq 0,001$  em relação ao grupo controle de cada tempo.

De modo geral, os resultados demonstram a alta eficiência das formulações desenvolvidas em inibir a replicação de SARS-CoV-2, o que está relacionado tanto às propriedades antivirais dos compostos bioativos, quanto à combinação dos mesmos através da nanoestruturação. Os ensaios com a solução 0,6% de ι-carragenana foram realizados por conta do grande potencial antiviral apresentado pelo polissacarídeo, de modo que fosse possível comparar a sua atividade em uma solução livre e em uma nanoestrutura. Além disso, a solução foi utilizada como controle uma vez que está presente nas formulações (FA e FB) a 0,6%. Assim, a nanoestruturação além de possibilitar a unificação de compostos, também potencializa as propriedades biológicas dos mesmos. Já em relação às atividades apresentadas por FA e FB, ambos os produtos foram viáveis nas concentrações e tempos determinados, se mostrando efetivos e seguros para aplicação como produtos antissépticos de uso tópico. Contudo, para uma maior diferenciação entre eles e identificação da contribuição de cada componente, novos ensaios com intervalos de concentrações menores que 1,8% devem ser conduzidos.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a viabilidade do desenvolvimento de uma nanoemulsão composta por um flavonoide, um óleo essencial e um revestimento polimérico pelo método de homogeneização de alta pressão. Em média, os nanosistemas caracterizaram-se por nanopartículas de 150 nm, PDI de 0,2 e potencial zeta a -10 mVa com cargas negativas. Os estudos de estabilidade demonstraram que as condições de armazenamento e concentração dos ativos determina a ocorrência de creaming e/ou sedimentação, sendo prevista uma validade mínima de 3 meses. Para extensão do período, a adição de conservantes deve ser considerada. Após a caracterização e estabilidade, duas formulações foram escolhidas para determinação da atividade biológica. Ambos os produtos apresentaram MIC de 1,25% para *S. aureus*, comprovando a ação bactericida. Já em relação aos efeitos na viabilidade celular e atividade virucida, as formulações apresentaram 100% de inibição da replicação de SARS-CoV-2, sendo consideradas seguras e efetivas para aplicação como produtos antissépticos de uso tópico. Além disso, a comparação entre os produtos e uma solução com ativo livre demonstrou que a aplicação da nanotecnologia possibilita uma amplificação da atividade biológica.

Ao final, o presente estudo comprovou sua hipótese e o cumpriu o objetivo principal, criando uma nanoemulsão antisséptica à base de compostos bioativos naturais de alta eficácia contra o SARS-CoV-2. Como perspectivas, novos testes de atividade bactericida e virucida com concentrações menores das nanoformulações devem ser conduzidos, a fim de diferenciar os produtos e identificar o papel de cada composto neste cenário. Além disso, ensaios com outros patógenos virais de transmissão por via respiratória - como influenza, por exemplo - também serão realizados, tendo em vista a ampliação do espectro de aplicação dos produtos desenvolvidos.

## 7. REFERÊNCIAS

ABIAN, Olga; ORTEGA-ALARCON, David; JIMENEZ-ALESANCO, Ana; CEBALLOS-LAITA, Laura; VEGA, Sonia; REYBURN, Hugh T.; RIZZUTI, Bruno; VELAZQUEZ-CAMPOY, Adrian. Structural stability of SARS-CoV-2 3CLpro and identification of quercetin as an inhibitor by experimental screening. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1693-1703, 2020.

ADITYA, N. P.; HAMILTON, Ian E.; NORTON, Ian T. Amorphous nano-curcumin stabilized oil in water emulsion: Physico chemical characterization. **Food Chemistry**, v. 224, p. 191-200, 2017.

AHMADI, Reza; SALARI, Soofia; SHARIFI, Mohammad D.; REIHANI, Hamidreza; ROSTAMIANI, Mohammad B.; BEHMADI, Morteza; TAHERZADEH, Zhila; ESLAMI, Saeed; REZAYAT, Seyed M.; JAAFARI, Mahmoud R.; ELYASI, Sepideh. Oral nano-curcumin formulation efficacy in the management of mild to moderate outpatient COVID-19: A randomized triple-blind placebo-controlled clinical trial. **Food Science & Nutrition**, v. 9, n. 8, p. 4068-4075, 2021.

ABDELBARY, Aly A.; ABD-ELSALAM, Wessam H.; AL-MAHALLAWI, Abdulaziz M. Fabrication of levofloxacin polyethylene glycol decorated nanoliposomes for enhanced management of acute otitis media: Statistical optimization, trans-tympanic permeation and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 559, p. 201-209, 2019.

ALZYOOD, Mamdooh; JACKSON, Debra; AVEYARD, Helen; BROOKE, Joanne. COVID-19 reinforces the importance of handwashing. **Journal of Clinical Nursing**, v. 29, n. 15-16, p. 2760-2761, 2020.

ANAND, Preetha; KUNNUMAKKARA, Ajaikumar B.; NEWMAN, Robert A.; AGGARWAL, Bharat B. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807-818, 2007.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico para produtos saneantes com ação antimicrobiana. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 14, de 28 de fevereiro de 2007.

ARBAIN, Noor H.; SALIM, Norazlinaliza; WUI, Wong T.; BASRI, Mahiran; RAHMAN, Mohd B. A. Optimization of quercetin loaded palm oil ester based nanoemulsion formulation for pulmonary delivery. **Journal of Oleo Science**, v. 67, n. 8, p. 933-940, 2018.

ASADI, Sima; BOUVIER, Nicole; WEXLER, Anthony S.; RISTENPART, William D. The coronavirus pandemic and aerosols: Does COVID-19 transmit via expiratory particles? **Aerosol Science and Technology**, 2020.

BABAEI, Fatemeh; NASSIRI-ASL, Marjan; HOSSEINZADEH, Hossein. Curcumin (a constituent of turmeric): new treatment option against COVID-19. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 10, p. 5215-5227, 2020.

BADHWAR, Reena; MANGLA, Bharti; NEUPANE, Yub R.; KHANNA, Kushagra; POPLI, Harvinder. Quercetin loaded silver nanoparticles in hydrogel matrices for diabetic wound healing. **Nanotechnology**, v. 32, n. 50, 2021.

BAKSI, Ruma; SINGH, Devendra P.; BORSE, Swapnil P.; RANA, Rita; SHARMA, Vipin; NIVSARKAR, Manish. *In vitro* and *in vivo* anticancer efficacy potential of quercetin loaded polymeric nanoparticles. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p.1513-1526, 2018.

BALATA, Gehan F.; ESSA, Ebtessam A.; SHAMARDL, Hanan A.; ZAIDAN, Samira H.; ABOUREHAB, Mohammed A. Self-emulsifying drug delivery systems as a tool to improve solubility and bioavailability of resveratrol. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 117-128, 2016.

BAMIDELE, Oluwaseun P.; EMMAMBUX, Mohammad N. Encapsulation of bioactive compounds by “extrusion” technologies: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 18, p. 3100-3118, 2020.

BANSAL, Shruti; JONSSON, Colleen B.; TAYLOR, Shannon L.; FIGUEROA, Juan M.; DUGOUR, Andrea V.; PALACIOS, Carlos; VEGA, Julio C. Iota-carrageenan and xylitol inhibit SARS-CoV-2 in Vero cells culture. **Plos One**, v. 16, n. 11, 2021.

BAQUERO, Fernando; MARTÍNEZ, José-Luis; CANTÓN, Rafael. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 260-265, 2008.

BAYDA, Samer; ADEEL, Muhammad; TUCCINARDI, Tiziano; CORDANI, Marco; RIZZOLIO, Flavio. The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical-physical applications to nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 112, 2020.

BHATIA, Riti; SINDHUJA, Tekumalla; BHATIA, Saurabh; GUPTA, Atula; GUPTA, Somesh. Iatrogenic dermatitis in times of COVID-19: a pandemic within a pandemic. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 34, n. 10, p. 563-566, 2020.

BIANCATELLI, Ruben M.; BERRILL, Max; CATRAVAS, John D.; MARIK, Paul E. Quercetin and vitamin C: an experimental, synergistic therapy for the prevention and treatment of SARS-CoV-2 related disease (COVID-19). **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 1451, 2020.

BERARDI, Alberto; PERINELLI, Diego R.; MERCHANT, Hamid A.; BISHARAT, Lorina; BASHETI, Iman A.; BONACUCINA, Giulia; CESPI, Marco; PALMIERI, Giovanni F. Hand sanitizers amid COVID-19: a critical review of alcohol-based products on the market and formulation approaches to respond to increasing demand. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 584, n. 119431, 2020.

BOLLIMPELLI, V. Satish.; KUMAR, Prashant; KUMARI, Sonali; KONDAPI, Anand K. Neuroprotective effect of curcumin-loaded lactoferrin nanoparticles against rotenone induced neurotoxicity. **Neurochemistry International**, v. 95, p. 37-45, 2016.

BOVARD, David; VAN DER TOORN, Marco; SCHLAGE, Walter K.; CONSTANT, Samuel; RENGGLI, Kasper; PEITSCH, Manuel C.; HOENG, Julia. Iota-carrageenan extracted from red algae is a potent inhibitor of SARS-CoV-2 infection in reconstituted human airway epithelia. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 29, p. 101-187, 2022.

BRUN, Paola; BERNABÈ, Giulia; FILIPPINI, Raffaella; PIOVAN, Anna. In vitro antimicrobial activities of commercially available tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oils. **Current Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 108-116, 2018.

BRUSOTTI, G.; CESARI, I.; DENTAMARO, A.; CACCIALANZA, G.; MASSOLINI, G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 218-228, 2014.

BU, Xiaotong; WANG, Xuehai; DAI, Lei; JI, Nai; XIONG, Liu; SUN, Qingjie. The combination of starch nanoparticles and tween 80 results in enhanced emulsion stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 2048-2059, 2020.

BULDAIN, Daniel; CASTILLO, Lihuel G.; MARCHETTI, María L.; LOZANO, Karen J.; BANDONI, Arnaldo; MESTORINO, Nora. Modeling the growth and death of *Staphylococcus aureus* against *Melaleuca armillaris* essential oil at different pH conditions. **Antibiotics**, v. 10, n. 2, p. 222, 2021.

BUNT, Craig R. Nanostructured formulations and drug delivery systems. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 23, n. 4, p. 315, 2018.

CADDEO, Carla; DÍEZ-SALES, Octavio; PONS, Ramon; FERNÁNDEZ-BUSQUETS, Xavier; FADDA, Anna M.; MANCONI, Maria. Topical anti-inflammatory potential of quercetin in lipid-based nanosystems: *in vivo* and *in vitro* evaluation. **Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 4, p. 959-968, 2013.

CAI, X.; FANG, Z.; DOU, J.; YU, A.; ZHAI, G. Bioavailability of Quercetin: Problems and Promises. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 20, p. 2572-2582, 2013.

CASTANGIA, Ines; NÁCHER, Amparo; CADDEO, Carla; VALENTI, Donatella; FADDA, Anna M.; DÍEZ-SALES, Octavio; RUIZ-SAURÍ, Amparo; MANCONI, Maria. Fabrication of quercetin and curcumin bionanovesicles for the prevention and rapid regeneration of full-thickness skin defects on mice. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 3, p. 1292-1300, 2014.



CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Community mitigation guidelines to prevent pandemic influenza. **Recommendations and Reports**, v. 66, n. 1, 2017.

CELLI, Giovana B.; LIU, Yan; DADMOHAMMADI, Younas; TIWARI, Rashmi; RAGHUPATHI, Krishna; MUTILANGI, William; ABBASPOURRAD, Alireza. Instantaneous interaction of mucin with pectin- and carrageenan-coated nano-emulsions. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125795, 2019.

CHAN, Jasper F.; YUAN, Shuofeng; KOK, Kin-Hang; TO, Kelvin K.; CHU, Hin; YANG, Jin; XING, Fanfan; LIU, Jiuling; YIP, Cyril C.; POON, Rosana W.; TSOI, Hoi-Wah; LO, Simon K.; CHAN, Kwok-Hung; POON, Vincent K.; CHAN, Wan-Mui; IP, Jonathan D.; CAI, Jian-Piao; CHENG, Vincent C.; CHEN, Honglin; HUI, Christopher K.; YUEN, Kwok-Yung. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. **The Lancet**, v. 395, n.10223, p. 514-523, 2020.

CHEMAT, Farid; VIAN, Maryline A.; RAVI, Harish K.; KHADHRAOUI, Boutheina; HILALI, Soukaina; PERINO, Sandrine; TIXIER, Anne-Sylvie F. Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: panorama, principles, applications and prospects. **Molecules**, v. 24, n. 3007, 2019.

CHITTASUPHO, Chuda; MANTHAISONG, Amornrat; OKONOGI, Siriporn; TADTONG, Sarin; SAMEE, Weerasak. Effects of quercetin and curcumin combination on antibacterial, antioxidant, in vitro wound healing and migration of human dermal fibroblast cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, p. 142, 2022.

CHUNG, Joo H.; LEE, Ji-Soo; LEE, Hyeon G. Resveratrol-loaded chitosan- $\gamma$ -poly(glutamic-acid) nanoparticles: optimization, solubility, UV stability and cellular antioxidant activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 186, p. 110702, 2019.

CLOGSTON, Jeffrey D.; PATRI, Anil K. Zeta potential measurement. **Methods in Molecular Biology**, v. 697, p. 63-70, 2011.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: 8th ed. **CLSI guideline M2-A8**, v. 23, n. 1, 2003.

COLLADO-GONZÁLEZ, Mar; FERRERI, Maria C.; FREITAS, Alessandra R.; SANTOS, Ana C.; FERREIRA, Nuno R.; CARISSIMI, Guzmán; SEQUEIRA, Joana A. D.; BAÑOS, Guillermo D.; VILLORA, Gloria; VEIGA, Francisco; RIBEIRO, Antonio. Complex polysaccharide-based nanocomposites for oral insulin delivery. **Marine Drugs**, v. 18, n. 1, p. 55, 2020.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 170-175, 2000.

CUNHA, Ludmylla; GRENHA, Ana. Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery applications. **Marine Drugs**, v. 14, n. 3, p. 42, 2016.

DANAEI, M.; DEGHANKHOLD, M.; ATAELI, S.; DAVARANI, F. H.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DAVEREY, Achlesh; DUTTA, Kasturi. COVID-19: eco-friendly hand hygiene for human and environmental safety. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 104754, 2020.

DAVID, Alexander V. A.; ARULMOLI, Radhakrishnan; PARASURAMAN, Subramani. Overviews of biological importance of quercetin: a bioactive flavonoid. **Pharmacognosy Reviews**, v. 10, n. 20, p. 84-89, 2016.

DE ASSIS, Karoll M. A.; LEITE, Joandra M. S.; DE MELO, Demis F.; BORGES, Joyce C.; SANTANA, Lucas M. B.; DOS REIS, Malu M. L.; MOREIRA, Vandiará M.; DA ROCHA, Wilma R. V.; CATÃO, Raïssa M. R.; DOS SANTOS, Sócrates G.; PORTELA, Alyne S.; SILVA, Samantha M. S.; DE OLIVEIRA, Tharcia K. B.; DA SILVEIRA, João W. S.; PIRES, Emanuene G.; NONAKA, Cassiano F. W.; SANCHES, Fátima A. C.; DAMASCENO, Bolívar

P. G. L. Bicontinuous microemulsions containing *Melaleuca alternifolia* essential oil as a therapeutic agent for cutaneous wound healing. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, n. 6, p. 1748-1763, 2020.

DECARO, Nicola; LORUSSO, Alessio. Novel human coronavirus (SARS-CoV-2): A lesson from animal coronaviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 244, n. 108693, 2020.

DEROSA, Giuseppe; MAFFIOLI, Pamela; D'ANGELO, Angela; DI PIERRO, Francesco. A role for quercetin in coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 3, p. 1230-1236, 2020.

DINIZ, Lúcio R. L.; SOUZA, Marília T. S.; DUARTE, Allana B. S.; DE SOUSA, Damião P. Mechanistic aspects and therapeutic potential of quercetin against COVID-19-associated acute kidney injury. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5772, 2020.

DYJA, Renata; JANKOWSKI, Andrzej. The effect of additives on release and in vitro skin retention of flavonoids from emulsion and gel semisolid formulations. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 39, n. 4, p. 442-449, 2017.

FALCI, Sávia P. P.; TEIXEIRA, Manoel A.; DAS CHAGAS, Pablo F.; MARTINEZ, Beatriz B.; LOYOLA, Ana Beatriz A. T.; FERREIRA, Lydia M.; VEIGA, Daniela F. Antimicrobial activity of *Melaleuca* sp. oil against clinical isolates of antibiotics resistant *Staphylococcus aureus*. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 491-496, 2015.

FARDOUS, Jannatul; OMOSO, Yuji; JOSHI, Akshat; YOSHIDA, Kozue; PATWARY, Md K. A.; ONO, Fumiyasu; IJIMA, Hiroyuki. Development and characterization of gel-in-water nanoemulsion as a novel drug delivery system. **Materials Science & Engineering C**, v. 124, n. 112076, 2021.

FERRARI, David M.; HOFFMANN, Johanna C.; SCHÖN, Michael P.; LIPPERT, Undine. Efficient removal of black henna tattoos. **Pediatric Dermatology**, v. 37, n. 6, p. 1063-1067, 2020.

FILARDO, Simone; DI PIETRO, Marisa; MASTROMARINO, Paola; SESSA, Rosa. Therapeutic potential of resveratrol against emerging respiratory viral infections. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 214, n. 107613, 2020.

FREDIANSYAH, Andri. The antiviral activity of iota-, kappa-, and lambda-carrageenan against COVID-19: A critical review. **Clinical Epidemiology and Global Health**, v. 12, p. 100826, 2021.

FRÖBA, Maria; GROBE, Maximilian; SETZ, Christian; RAUCH, Pia; AUTH, Janina; SPANAUS, Lucas; MÜNCH, Jan; RUETALO, Natalia; SCHINDLER, Michael; MOROKUTTI-KURZ, Martina; GRAF, Philipp; PRIESCHL-GRASSAUER, Eva; GRASSAUER, Andreas; SCHUBERT, Ulrich. Iota-Carrageenan Inhibits Replication of SARS-CoV-2 and the Respective Variants of Concern Alpha, Beta, Gamma and Delta. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13202, 2021.

GALINIAK, Sabina; AEBISHER, David; BARTUSIK-AEBISHER, Dorota. Health benefits of resveratrol administration. **Acta Biochimica Polonica**, v. 66, n. 1, p. 13-21, 2019.

GNATTA, Juliana R.; POVEDA, Vanessa B.; PADOVEZE, Maria C.; GRAZIANO, Kazuko U.; TURRINI, Ruth N. T.; DA SILVA, Maria J. P. *Melaleuca alternifolia* essential oil soap: a potential alternative for hand hygiene. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 40, n. 7, p. 1517-1520, 2021.

GRICE, I. D.; MARIOTTINI, G. L. Chapter 20: Glycans with antiviral activity from marine organisms in **Marine Organisms as Model Systems in Biology and Medicine, Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 65, p. 439-475, 2018.

GOKHALE, Jayanti P.; MAHAJAN, Hitendra S.; SURANA, Sanjay S. Quercetin loaded nanoemulsion-based gel for rheumatoid arthritis: *in vivo* and *in vitro* studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 112, n. 108622, 2019.

GOLIN, Andrew P.; CHOI, Dexter; GHAHARY, Aziz. Hand sanitizers: a review of ingredients, mechanisms of action, modes of delivery and efficacy against coronaviruses. **American Journal of Infection Control**, v. 48, n. 9, p. 1062-1067, 2020.

GOUR, Aman; JAIN, Narendra K. Advances in green synthesis of nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 844-851, 2019.

GU, Yue-Yu; ZHANG, Min; CEN, Huan; WU, Yi-Fan; LU, Zhaoyu; LU, Fuhua; LIU, Xu-Sheng; LAN, Hui-Yao. Quercetin as a potential treatment for COVID-19-induced acute kidney injury: based on network pharmacology and molecular docking study. **Plos One**, v. 16, n. 1, 2021.

GU, Yeun S.; DECKER, Eric A.; MCCLEMENTS, Julian. Influence of pH and  $\kappa$ -carrageenan concentration on physicochemical properties and stability of  $\beta$ -lactoglobulin-stabilized oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3626-3632, 2004.

GUPTA, Mohit K.; LIPNER, Shari R. Hand hygiene in preventing COVID-19 transmission. **CUTIS**, v. 105, n. 5, p. 233-234, 2020.

GÜRAN, Mümtaz; ŞANLITÜRK, Gizem; KERKÜKLÜ, Namik R.; ALTUNDAĞ, Ergül M.; YALÇIN, Suhâ. Combined effects of quercetin and curcumin on anti-inflammatory and antimicrobial parameters *in vitro*. **European Journal of Pharmacology**, v. 859, n. 172486, 2019.

GUZMAN-VILLANUEVA, Diana; EL-SHERBINY, Ibrahim M.; HERRERA-RUIZ, Dea; SMYTH, Hugh D. C. Design and *in vitro* evaluation of a new nano-microparticulate system for enhanced aqueous-phase solubility of curcumin. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

HARVEY, Alan L.; EDRADA-EBEL, RuAngelie; QUINN, Ronald J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111-129, 2015.

HASSANIAZAD, Mehdi; EFTEKHAR, Ebrahim; INCHEHSABLAGH, Behnaz R.; KAMALI, Hossein; TOUSI, Abdolali; JAAFARI, Mahmoud R.; RAFAT, Milad; FATHALIPOUR, Mohammad; NIKOOFAL-SAHLABADI, Sara; GOUKLANI, Hamed;

ALIZADE, Hesam; NIKPOOR, Amin R. A triple-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial to evaluate the effect of curcumin-containing nanomicelles on cellular immune responses subtypes and clinical outcome in COVID-19 patients. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 11, p. 6417-6427, 2021.

HUANG, Yu; WANG, Zewei; ZHANG, Guiju; REN, Jie; YU, Li; LIU, Xuhan; YANG, Yuanxi; RAVINDRAN, Abirami; WONG, Chloe; CHEN, Rongjun. A pH/redox-dual responsive, nanoemulsion-embedded hydrogel for efficient oral delivery and controlled intestinal release of magnesium ions. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 9, n. 7, p. 1888-1895, 2021.

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses: Coronaviridae Study Group. The species *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, p.536-544, 2020.

JAHANGIRIAN, Hossein; LEMRASKI, Ensieh G.; WEBSTER, Thomas J.; RAFIEE-MOGHADDAM, Roshanak; ABDOLLAHI, Yadollah. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2957-2978, 2017.

JAIN, Akhlesh K.; THAREJA, Suresh. *In vitro* and *in vivo* characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 524-539, 2019.

JAISWAL, Lily; SHANKAR, Shiv; RHIM, Jong-Whan. Carrageenan-based functional hydrogel film reinforced with sulfur nanoparticles and grapefruit seed extract for wound healing application. **Carbohydrate Polymers**, v. 224, n. 115191, 2019.

JANG, Yejin; SHIN, Heegwon; LEE, Myoung Kyu; KWON, Oh Seung; SHIN, Jin Soo; KIM, Yong-il; KIM, Chan Woo; LEE, Hye-Ra; KIM, Meehyein. Antiviral activity of lambda-carrageenan against influenza viruses and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 821, 2021.

JING, Jane L. J.; YI, Thong P.; BOSE, Rajendran J. C.; MCCARTHY, Jason R.; THARMALINGAM, Nagendran; MADHESWARAN, Thiagarajan. Hand sanitizers: a review on formulations aspects, adverse effects and regulations. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 9, 2020.

JONES, Dena; CABALLERO, Sarah; DAVIDOV-PARDO, Gabriel. Bioavailability of nanotechnology-based bioactives and nutraceuticals. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 88, p. 235-273, 2019.

JONES, Nicola. How COVID-19 is changing the cold and flu season. **Nature**, v. 588, n. 7838, p. 388-390, 2020.

KARTHIK, P.; EZHILARASI, P. N.; ANANDHARAMAKRISHMAN, C. Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 7, p. 1435-1450, 2015.

KOTHA, Raghavendhar R.; LUTHRIA, Devanand L. Curcumin: biological, pharmaceutical, nutraceutical and analytical aspects. **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 2930, 2019.

LARSON, Elaine L.; HUGHES, Carrie A. N.; PYREK, Janine D.; SPARKS, Sheila M.; CAGATAY, Esra U.; BARTKUS, Joanne M. Changes in bacterial flora associated with skin damage on hands of health care personnel. **American Journal of Infection Control**, v. 26, n. 5, p. 513-521, 1998.

LEAL, Carla M.; LEITÃO, Suzana G.; SAUSSET, Romain; MENDONÇA, Simony C.; NASCIMENTO, Pedro H. A.; CHEOHEN, Caio A. R.; ESTEVES, Maria A.; SILVA, Manuela L.; GONDIM, Tayssa S.; MONTEIRO, Maria S.; TUCCI, Amanda R.; FINTELMAN-RODRIGUES, Natália; SIQUEIRA, Marilda M.; MIRANDA, Milene D.; COSTA, Fernanda N.; SIMAS, Rosineide C.; LEITÃO, Gilda G. Flavonoids from *Siparuna cristata* as potential inhibitors of SARS-CoV-2 replication. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 5, p. 658-666, 2021.

LEE, Joo Young; LEE, Sanghee; CHOI, Jang Ho; NA, Kun.  $\iota$ -Carrageenan nanocomposites for enhanced stability and oral bioavailability of curcumin. **Biomaterials Research**, v. 25, n. 1, p. 32, 2021.

LEFEVRE, Lauren; FERREIRA, Adriana M.; VILHENA, Jessica C. E.; FLORENTINO, Alexandro C.; CRUZ, Rodrigo A. S.; BERAU, Didier; ROBINSON, Jean-Charles; AMADO, Jesús R. R.; CARVALHO, José C. T.; FERNANDES, Caio P. Development of quercetin based nanodispersions. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 18, p. 2051-2056, 2016.

LESTARI, Maria L. A. D.; INDRAYANTO, Gunawan. Curcumin. **Profile of Drugs Substances, Excipients and Related Methodology**, v. 39, p. 113-204, 2014.

LI, Liang; NI, Rui; SHAO, Yang; MAO, Shirui. Carrageenan and its applications in drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 1-11, 2014.

LI, Xinghua; DUAN, Songwei; CHU, Cordia; XU, Jun; ZENG, Gucheng; LAM, Alfred K.; ZHOU, Junmei; YIN, Yue; FANG, Danyun; REYNOLDS, Maxwell J.; GU, Huaiyu; JIANG, Lifang. *Melaleuca alternifolia* concentrate inhibits *in vivo* entry of influenza virus into host cells. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9550-9566, 2013.

LI, Xiu-Mei; LI, Zhong-Yuan; WANG, Ya-Dong; WANG, Jin-Quan; YANG, Pei-Long. Quercetin inhibits the proliferation and aflatoxins biosynthesis of *Aspergillus flavus*. **Toxins**, v. 11, n. 3, p. 154, 2019.

LI, Yue-Qing; LI, Ze-Lin; ZHAO, Wei-Jie; WEN, Rui-Xing; MENG, Qing-Wei; ZENG, Yi. Synthesis of stilbene derivatives with inhibition of SARS coronavirus replication. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 9, p. 1084-1089, 2006.

LIN, Shih-chao; HO, Chi-tang; CHUO, Wen-ho; LI, Shiming; WANG, Tony T.; LIN, Chi-chen. Effective inhibition of MERS-CoV infection by resveratrol. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 144, 2017.



LIU, Qingqing; HUANG, He; CHEN, Honghong; LIN, Junfan; WANG, Qin. Food-grade nanoemulsions: preparation, stability and application in encapsulation of bioactive compounds. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 4242, 2019.

LU, Roujian; ZHAO, Xiang; LI, Juan; NIU, Peihua; YANG, Bo; WU, Honglong; WANG, Wenling; SONG, Hao; HUANG, Baoying; ZHU, Na; BI, Yuhai; MA, Xuejun; ZHAN, Faxian; WANG, Liang; HU, Tao; ZHOU, Hong; HU, Zhenhong; ZHOU, Weimin; ZHAO, Li; CHEN, Jing; MENG, Yao; WANG, Ji; LIN, Yang; YUAN, Jianying; XIE, Zhihao; MA, Jinmin; LIU, William J.; WANG, Dayan; XU, Wenbo; HOLMES, Edward C.; GAO, George F.; WU, Guizhen; CHEN, Weijun; SHI, Weifeng; TAN, Wenjie. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565-574, 2020.

MAHADEV, Manohar; NANDINI, Hittanahalli S.; RAMU, Ramith; GOWDA, Devegowda V.; ALMARHOON, Zainab M.; AL-GHORBANI, Mohammed; MABKHOT, Yahia N. Fabrication and evaluation of quercetin nanoemulsion: a delivery system with improved bioavailability and therapeutic efficacy in diabetes mellitus. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 1, p. 70, 2022.

MAHMOOD, Adeel; EQAN, Maryam; PERVEZ, Saher; ALGHAMDI, Huda A.; TABINDA, Amtul B.; YASAR, Abdullah; BRINDHADEVI, Kathirvel; PUGAZHENDHI, Arivalagan. COVID-19 and the frequent use of hand sanitizers; human health and environmental hazards by exposure pathways. **Science of the Total Environment**, v. 742, n. 140561, 2020.

MANTIL, Elisabeth; DALY, Grace; AVIS, Tyler J. Effect of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil as a natural antimicrobial agent in lipophilic formulations. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 82-88, 2015.

MANZOOR, Muhammad F.; HUSSAIN, Abid; SAMEEN, Aysha; SAHAR, Amna; KHAN, Sipper; SIDDIQUE, Rabia; AADIL, Rana M.; XU, Bin. Novel extraction, rapid assessment and bioavailability improvement of quercetin: a review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 78, n. 105686, 2021.

MARYAMABADI, Ammar; HASANINEJAD, Alireza; NOWROUZI, Najmeh; MOHEBBI, Gholamhossein; ASGHARI, Behvar. Application of PEG-400 as a green biodegradable polymeric medium for the catalyst-free synthesis of spiro-dihydropyridines and their use as acetyl and butyrylcholinesterase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 1408-1417, 2016.

MAURYA, Vimal K.; KUMAR, Swatantra; PRASAD, Anil K.; BHATT, Madan L. B.; SAXENA, Shailendra K. Structure-based drug designing for potential antiviral activity of selected natural products from Ayurveda against SARS-CoV-2 spike glycoprotein and its cellular receptor. **VirusDisease**, v. 31, n. 2, p. 179-193, 2020.

MOROKUTTI-KURZ, Martina; FRÖBA, Maria; GRAF, Philipp; GROSSE, Maximilian; GRASSAUER, Andreas; AUTH, Janina; SCHUBERT, Ulrich; PRIESCHL-GRASSAUER, Eva. Iota-carrageenan neutralizes SARS-CoV-2 and inhibits viral replication in vitro. **Plos One**, v. 16, n. 2, 2021.

NAIDOO, Devashan; ROY, Ayan; KAR, Pallab; MUTANDA, Taurai; ANANDRAJ, Akash. Cyanobacterial metabolites as promising drug leads against the M<sup>pro</sup> and PL<sup>pro</sup> of SARS-CoV-2: an *in silico* analysis. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, n. 16, p. 6218-6230, 2020.

NORALIAN, Zoha; GASHTI, Mazeyar P.; MOGHADDAM, Milad R.; TAYYEB, Hossein; ERFANIAN, Isa. Ultrasonically developed silver/iota-carrageenan/cotton bionanocomposite as an efficient material for biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 180, p. 439-457, 2021.

OLIVER, Susan; YEE, Eugene; KAVALLARIS, Maria; VITTORIO, Orazio; BOYER, Cyrille. Water soluble antioxidant dextran-quercetin conjugate with potential anticancer properties. **Macromolecular Bioscience**, v. 1700239, 2018.

PAL, Arijit; TRIPATHI, Anusri. Quercetin inhibits carbapenemase and efflux pump activities among carbapenem-resistant gram-negative bacteria. **Journal of Pathology, Microbiology and Immunology**, v. 128, n. 3, p. 251-259, 2019.

PALESTINO, Gabriela; GARCÍA-SILVA, Ileana; GONZÁLEZ-ORTEGA, Omar; ROSALES-MENDOZA, Sergio. Can nanotechnology help in the fight against COVID-19? **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 18, n. 9, p. 849-864, 2020.

PANGESTUTI, Ratih; KIM, Se-Kwon. Biological activities of carrageenan. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 72, p. 113-124, 2014.

PASQUEREAU, Sébastien; NEHME, Zeina; AHMAD, Sandy H.; DAOUAD, Fadoua; ASSCHE, Jeanne V.; WALLET, Clémentine; SCHWARTZ, Christian; ROHR, Olivier; MOROT-BIZOT, Stéphanie; HERBEIN, Georges. Resveratrol inhibits HCoV-229E and SARS-CoV-2 coronavirus replication in vitro. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 354, 2021.

PAULA, Helga; HÜBNER, Nils-Olaf; ASSADIAN, Ojan; BRANSMÖLLER, Katja; BAGUHL, Romy; LÖFFLER, Harald; KRAMER, Axel. Effect of hand lotion on the effectiveness of hygienic hand antiseptics: implications for practicing hand hygiene. **American Journal of Infection Control**, v. 45, n. 8, p. 835-838, 2017.

PEREIRA, Leonel; CRITCHLEY, Alan T. The COVID-19 novel coronavirus pandemic 2020: seaweeds to the rescue? Why does substantial, supporting research about the antiviral properties of seaweed polysaccharides seem to go unrecognized by the pharmaceutical community in these desperate times? **Journal of Applied Phycology**, v. 32, p. 1875-1877, 2020.

PICHOT, R.; SPYROPOULOS, F.; NORTON, I. T. O/W emulsions stabilised by both low molecular weight surfactants and colloidal particles: The effect of surfactant type and concentration. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 352, n. 1, p. 128-135, 2010.

PRADHAN, Deepak; BISWASROY, Prativa; NAIK, Pradeep K.; GHOSH, Goutam; RATH, Goutam. A review of current interventions for COVID-19 prevention. **Archives of Medical Research**, v. 51, n. 5, p. 363-374, 2020.

PUJARA, Naisarg; JAMBHRUNKAR, Siddharth; WONG, Kuan Y.; MCGUCKIN, Michael; POPAT, Amirali. Enhanced colloidal stability, solubility and rapid dissolution of resveratrol by nanocomplexation with soy protein isolate. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 488, p. 303-308, 2016.

RACHMAWATI, Heni; BUDIPUTRA, Dewa K.; MAULUDIN, Rachmat. Curcumin nanoemulsion for transdermal application: formulation and evaluation. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 4, p. 560-566, 2014.

RAI, Mahendra; BONDE, Shital; YADAV, Alka; BHOWMIK, Arpita; RATHOD, Sanjay; INGLE, Pramod; GADE, Aniket. Nanotechnology as a shield against COVID-19: current advancement and limitations. **Viruses**, v. 13, n. 7, p. 1224, 2021.

RAI, Vineet K.; MISHRA, Nidhi; YADAV, Kuldeep S.; YADAV, Narayan P.. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **Journal of Controlled Release**, v. 270, p. 203-225, 2018.

RAJAGOPAL, Kalirajan; VARAKUMAR, Potlapati; BALIWADA, Aparma; BYRAN, Gowramma. Activity of phytochemical constituents of *Curcuma longa* (turmeric) and *Andrographis paniculata* against coronavirus (COVID-19): an in silico approach. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 104, 2020.

RAMDANI, L. H.; BACHARI, K. Potential therapeutic effects of resveratrol against SARS-CoV-2. **Acta Virologica**, v. 64, n. 3, p. 276-280, 2020.

RATTIS, Bruna A. C.; RAMOS, Simone G.; CELES, Mara R. N. Curcumin as a potential treatment for COVID-19. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. 675287, 2021.

RATZ-ŁYKO, Anna; ARCT, Jacek. Resveratrol as an active ingredient for cosmetic and dermatological applications: a review. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 21, n. 2, p. 84-90, 2018.

RICHA, Richa; CHOUDHURY, Anirban R. Exploration of polysaccharide based nanoemulsions for stabilization and entrapment of curcumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 156, p. 1287-1296, 2019.

ROBINSON, Keila; MOCK, Charlotta; LIANG, Dong. Pre-formulation studies of resveratrol. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 9, p. 1464-1469, 2015.

ROTHER, Camilla; SCHUNK, Mirjam; SOTHMANN, Peter; BRETZEL, Gisela; FROESCHL, Guenter; WALLRAUCH, Claudia; ZIMMER, Thorbjörn; THIEL, Verena; JANKE, Christian; GUGGEMOS, Wolfgang; SEILMAIER, Michael; DROSTEN, Christian; VOLLMAR, Patrick; ZWIRGLMAIER, Katrin; ZANGE, Sabine; WÖLFEL, Roman; HOELSCHER, Michael. Transmission of 2019-nCoV infection from an asymptomatic contact in Germany. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 10, p. 970-971, 2020.

RUFATO, Késsily B.; SOUZA, Paulo R.; OLIVEIRA, Ariel C.; BERTON, Sharise B. R.; SABINO, Roberta M.; MUNIZ, Edvani C.; POPAT, Ketul C.; RADOVANOVIC, Eduardo; KIPPER, Matt J.; MARTINS, Alessandro F. Antimicrobial and cytocompatible chitosan, N,N,N-trimethyl chitosan, and tanfloc-based polyelectrolyte multilayers on gellan gum films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 727-742, 2021.

RUNDLE, Chandler W.; PRESLEY, Colby L.; MILITELLO, Michelle; BARBER, Cara; POWELL, Douglas L.; JACOB, Sharon E.; ATWATER, Amber R.; WATSKY, Kalman L.; YU, Jiade; DUNNICK, Cory A. Hand hygiene during COVID-19: recommendations from the American Contact Dermatitis Society. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 83, n. 6, p. 1730-1737, 2020.

RUSSO, Maria; MOCCIA, Stefania; SPAGNUOLO, Carmela; TEDESCO, Idolo; RUSSO, Gian L. Roles of flavonoids against coronavirus infection. **Chemico-Biological Interactions**, v. 328, n. 109211, 2020.

SABER-MOGHADDAM, Niloofar; SALARI, Soofia; HEJAZI, Sepideh; AMINI, Mahnaz; TAHERZADEH, Zhila; ESLAMI, Saeed; REZAYAT, Seyed M.; JAAFARI, Mahmoud R.; ELYASI, Sepideh. Oral nano-curcumin formulation efficacy in management of mild to moderate hospitalized coronavirus disease-19 patients: An open label nonrandomized clinical trial. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 5, p. 2616-2623, 2021.

SALEM, Heba F.; KHARSHOUM, Rasha M.; ABOU-TALEB, Heba A.; NAGUIB, Demiana M. Nanosized nasal emulgel of resveratrol: preparation, optimization, *in vitro* evaluation and

*in vivo* pharmacokinetic study. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 45, n. 10, p. 1624-1634, 2019.

SARAVANA, Periaswamy S.; SHANMUGAPRIYA, Karuppusamy; GERENIU, Collin R. N.; CHAE, Sol-Ji; KANG, Hyun W.; WOO, Hee-Chul; CHUN, Byung-Soo. Ultrasound-mediated fucoxanthin rich oil nanoemulsions stabilized by  $\kappa$ -carrageenan: process optimization, bioaccessibility and cytotoxicity. **Ultrasonics-Sonochemistry**, v. 55, p. 105-116, 2019.

SAUNDERS-HASTINGS, Patrick; CRISPO, James A. C.; SIKORA, Lindsey; KREWSKI, Daniel. Effectiveness of personal protective measures in reducing pandemic influenza transmission: a systematic review and meta-analysis. **Epidemics**, v. 20, 2017.

SCHÜTZ, Desiree; CONZELMANN, Carina; FOIS, Giorgio; GROß, Rüdiger; WEIL, Tatjana; WETTSTEIN, Lukas; STENGER, Steffen; ZELIKIN, Alexander; HOFFMANN, Thomas K.; FRICK, Manfred; MÜLLER, Janis A.; MÜNCH, Jan. Carrageenan-containing over-the-counter nasal and oral sprays inhibit SARS-CoV-2 infection of airway epithelial cultures. **American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 320, n. 5, p. L750-L756, 2021.

ŚCIESZKA, Sylwia; KLEWICKA, Elżbieta. Algae in food- a general review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 21, p. 3538-3547, 2018.

SHANG, Li; NIENHAUS, Karin; NIENHAUS, Gerd U. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, p. 5, 2014.

SHANMUGAPRIYA, Karuppusamy; KIM, Hyejin; KANG, Hyun W. A new alternative insight of nanoemulsion conjugated with  $\kappa$ -carrageenan for wound healing study in diabetic mice: In vitro and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 133, p. 236-250, 2019.

SHANNON, Emer; ABU-GHANNAM, Nissreen. Antibacterial derivatives of marine algae: an overview of pharmacological mechanisms and applications. **Marine Drugs**, v. 14, n. 4, p. 81, 2016.

SINGH, Yengkhom D.; NINGTHOUJAM, Rina; PANDA, Manasa K.; JENA, Barsarani; BABU, Punuri J.; MISHRA, Avanindra K. Insight from nanomaterials and nanotechnology towards COVID-19. **Sensors International**, v. 2, p. 100099, 2021.

SON, Hye-Yeon; LEE, Mak-Soon; CHANG, Eugene; KIM, Seog-Young; KANG, Bori; KO, Hyunmi; KIM, In-Hwan; ZHONG, Qixin; JO, Young-Hee; KIM, Chong-Tai; KIM, Yangha. Formulation and characterization of quercetin-loaded oil in water nanoemulsion and evaluation of hypocholesterolemic activity in rats. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 244, 2019.

SOUZA, Ricardo B.; FROTA, Annyta F.; SILVA, Joana; ALVES, Celso; NEUGEBAUER, Agnieszka Z.; PINTEUS, Susete; RODRIGUES, José A. G.; CORDEIRO, Edna M. S.; ALMEIDA, Raimundo R.; PEDROSA, Rui; BENEVIDES, Norma M. B. *In vitro* activities of kappa-carrageenan isolated from red marine alga *Hypnea musciformis*: antimicrobial, anticancer and neuroprotective potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 1248-1256, 2018.

SU, Shuo; WONG, Gary; SHI, Weifeng; LIU, Jun; LAI, Alexander C. K.; ZHOU, Jiyong; LIU, Wenjun; BI, Yuhai; GAO, George F. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 490-502, 2016.

TAN, See W.; OH, Choon C. Contact dermatitis from hand hygiene practices in the COVID-19 pandemic. **Annals of the Academy of Medicine, Singapore**, v. 49, n. 9, p. 674-676, 2020.

TIAN, Bingren; LIU, Jiayue. Resveratrol: a review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 4, p. 1392-1404, 2019.

TRAN, Hien A.; LY, Khanh L.; FOX, Kate E.; TRAN, Phong A.; NGUYEN, Thi-Hiep. Immobilization of antimicrobial silver and antioxidant flavonoid as a coating for wound dressing materials. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 9929-9939, 2019.

TRAN, Thanh H.; GUO, Yi; SONG, Donghui; BRUNO, Richard S.; LU, Xiuling. Quercetin-containing self-nanoemulsifying drug delivery system for improving oral bioavailability. **Pharmaceutical Biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 840-852, 2014.

VALIZADEH, Hamed; ABDOLMOHAMMADI-VAHID, Samaneh; DANSHINA, Svetlana; GENCER, Mehmet Z.; AMMARI, Ali; SADEGHI, Armin; ROSHANGAR, Leila; ASLANI, Saeed; ESMAEILZADEH, Abdolreza; GHAEBI, Mahnaz; VALIZADEH, Sepehr; AHMADI, Majid. Nano-curcumin therapy, a promising method in modulating inflammatory cytokines in COVID-19 patients. **International Immunopharmacology**, v. 89, p. 107088, 2020.

VAN DOREMALEN, Neeltje; BUSHMAKER, Trenton; MORRIS, Dylan H.; HOLBROOK, Myndi G.; GAMBLE, Amandine; WILLIAMSON, Brandi N.; TAMIN, Azaibi; HARCOURT, Jennifer L.; THORNBURG, Natalie J.; GERBER, Susan I.; LLOYD-SMITH, James O.; DE WIT, Emmie; MUNSTER, Vincent J. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 16, p. 1564-1567, 2020.

VAZ, Gustavo Richter; CLEMENTINO, Adryana; BIDONE, Juliana; VILLETTI, Marcos Antonio; FALKEMBACH, Mariana; BATISTA, Matheus; BARROS, Paula; SONVICO, Fabio; DORA, Cristiana. Curcumin and quercetin-loaded nanoemulsions: physicochemical compatibility study and validation of a simultaneous quantification method. **Nanomaterials**, v. 10, n. 9, p. 1650, 2020.

VECCHIONE, Raffaele; QUAGLIARIELLO, Vincenzo; CALABRIA, Dominic; CALCAGNO, Vincenzo; DE LUCA, Elisa; IAFFAIOLI, Rosario V.; NETTI, Paolo A. Curcumin bioavailability from oil in water nano-emulsions: *in vitro* and *in vivo* study on the dimensional, compositional and interactional dependence. **Journal of Controlled Release**, v. 233, p. 88-100, 2016.

WANG, Bo; TIAN, Haiyan; XIANG, Dong. Stabilizing the oil-in-water emulsions using the mixtures of *Dendrobium officinale* polysaccharides and gum arabic or propylene glycol alginate. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 759, 2020.

WANG, Li; GUAN, Xueqian; ZHENG, Cunchuan; WANG, Na; LU, Hongsheng; HUANG, Zhiyu. New low-energy method for nanoemulsion formation: pH regulation based on fatty acid/amine complexes. **Langmuir**, v. 36, n. 34, p. 10082-10090, 2020.



WANG, Qiang; HU, Caibiao; ZHANG, Hong; ZHANG, Yali; LIU, Tian; QIAN, Airui; XIA, Qiang. Evaluation of a new solid non-aqueous self-double-emulsifying drug delivery system for topical application of quercetin. **Journal of Microencapsulation**, v. 33, n. 8, p. 785-794, 2016.

WEN, Chih-Chun; KUO, Yueh-Hsiung; JAN, Jia-Tsong; LIANG, Po-Huang; WANG, Sheng-Yang; LIU, Hong-Gi; LEE, Ching-Kuo; CHANG, Shang-Tzen; KUO, Chih-Jung; LEE, Shoei-Sheng; HOU, Chia-Chung; HSIAO, Pei-Wen; CHIEN, Shih-Chang; SHYUR, Lie-Fen; YANG, Ning-Sun. Specific plant terpenoids and lignoids possess potent antiviral activities against severe acute respiratory syndrome coronavirus. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4087-4095, 2007.

WHO (a), World Health Organization. Disease outbreak news - 05.01.2020. Disponível em: <<https://www.who.int/csr/don/05-january-2020-pneumonia-of-unkown-cause-china/en/>>.

Último acesso em 04.02.2021.

WHO (b), World Health Organization. Disease outbreak news - 12.01.2020. Disponível em: <<https://www.who.int/csr/don/12-january-2020-novel-coronavirus-china/en/>>. Último acesso em 04.02.2021.

WHO (c), World Health Organization. Novel coronavirus (2019-nCoV): Situation report 11 - 31.01.2020. Disponível em:

<[https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200131-sitrep-11-ncov.pdf?sfvrsn=de7c0f7\\_4](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200131-sitrep-11-ncov.pdf?sfvrsn=de7c0f7_4)>. Último acesso em 04.02.2021.

WHO (d), World Health Organization. Novel coronavirus (2019-nCoV): Situation report 22 - 11.02.2020. Disponível em:

<[https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200211-sitrep-22-ncov.pdf?sfvrsn=fb6d49b1\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200211-sitrep-22-ncov.pdf?sfvrsn=fb6d49b1_2)>. Último acesso em 04.02.2021.

WHO (e), World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Situation report 51 - 11.03.2020. Disponível em:

<[https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57\\_10](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57_10)>. Último acesso em: 04.02.2021.

WHO (f), World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Advice for the public. Disponível em:

<<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/advice-for-public>>.

Último acesso em 04.02.2021.

WHO (g), World Health Organization. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease (COVID-19): interim guidance, 2021.

WILLIAMSON, Gary; KERIMI, Asimina. Testing of natural products in clinical trials targeting the SARS-CoV-2 (COVID-19) viral spike protein-angiotensin converting enzyme-2 (ACE2) interaction. **Biochemical Pharmacology**, v. 178, n. 114123, 2020.

XIAO, Shuzhen; CUI, Peng; SHI, Wanliang; ZHANG, Ying. Identification of essential oils with activity against stationary phase *Staphylococcus aureus*. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, p. 99, 2020.

XU, Renjie; JIANG, Cuiping; ZHOU, Lijing; LI, Bin; HU, Yi; GUO, Yujie; XIAO, Xuecheng; LU, Shan. Fabrication of stable apigenin nanosuspension with PEG 400 as antisolvent for enhancing the solubility and bioavailability. **AAPS PharmSciTech**, v. 23, n. 1, p. 12, 2021.

YANG, Dongki. Application of nanotechnology in the COVID-19 pandemic. **International Journal of Nanomedicine**, v. 16, p. 623-649, 2021.

YANG, Minghui; WEI, Jinli; HUANG, Ting; LEI, Luping; SHEN, Chenguang; LAI, Jinzhi; YANG, Min; LIU, Lei; YANG, Yang; LIU, Guoshi; LIU, Yingxia. Resveratrol inhibits the replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in cultured Vero cells. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 3, p. 1127-1129, 2020.

YETISGIN, Abuzer A.; CETINEL, Sibel; ZUVIN, Merve; KOSAR, Ali; KUTLU, Ozlem. Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications. **Molecules**, v. 25, n. 9, p. 2193, 2020.

YOUN, Bock-Hui; KIM, Yeon-Suk; YOO, Seungmin; HUR, Myung-Haeng. Antimicrobial and hand hygiene effects of tea tree essential oil disinfectant: a randomized control trial. **International Journal of Clinical Practice**, v. 75, n. 8, 2021.

ZAHEDIPOUR, Fatemeh; HOSSEINI, Seyede A.; SATHYAPALAN, Thozhukat; MAJEED, Muhammed; JAMIALAHMADI, Tannaz; AL-RASADI, Khalid; BANACH, Maciej; SAHEBKAR, Amirhossein. Potential effects of curcumin in the treatment of COVID-19 infection. **Phytotherapy Research**, 2020.

ZHENG, Jun. SARS-CoV-2: an emerging coronavirus that causes a global threat. **International Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 10, p. 1678-1685, 2020.

ZHOU, Peng; YANG, Xing-Lou; WANG, Xian-Guang; HU, Ben; ZHANG, Lei; ZHANG, Wei; SI, Hao-Rui; ZHU, Yan; LI, Bei; HUANG, Chao-Lin; CHEN, Hui-Dong; CHEN, Jing; LUO, Yun; GUO, Hua; JIANG, Ren-Di; LIU, Mei-Qin; CHEN, Ying; SHEN, Xu-Rui; WANG, Xi; ZHENG, Xiao-Shuang; ZHAO, Kai; CHEN, Quan-Jiao; DENG, Fei; LIU, Lin-Lin; YAN, Bing; ZHAN, Fa-Xian; WANG, Yan-Yi; XIAO, Geng-Fu; SHI, Zheng-Li. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. **Nature**, v. 579, p. 270-273, 2020.

ZHU, Na; ZHANG, Dingyu; WANG, Wenling; LI, Xingwang; YANG, Bo; SONG, Jingdong; ZHAO, Xiang; HUANG, Baoying; SHI, Weifeng; LU, Roujian; NIU, Peihua; ZHAN, Faxian; MA, Xuejun; WANG, Dayan; XU, Wenbo; WU, Guizhen; GAO, George F.; TAN, Wenjie. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727-733, 2020.

ZIELIŃSKA, Aleksandra; MARTINS-GOMES, Carlos; FERREIRA, Nuno R.; SILVA, Amélia M.; NOWAK, Izabela; SOUTO, Eliana B. Anti-inflammatory and anti-cancer activity of citral: optimization of citral-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) using experimental factorial design and LUMiSizer®. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 553, p. 428-440, 2018.

ZIELIŃSKA, Aleksandra; FERREIRA, Nuno R.; FELICZAK-GUZIŁ, Agnieszka; NOWAK, Izabela; SOUTO, Eliana B. Loading, release profile and accelerated stability assessment of

monoterpenes-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 25, n. 7, p. 832-844, 2020.

ZOU, Lirong; RUAN, Feng; HUANG, Mingxing; LIANG, Lijun; HUANG, Huitao; HONG, Zhongsi; YU, Jianxiang; KANG, Min; SONG, Yingchao; XIA, Jinyu; GUO, Qianfang; SONG, Tie; HE, Jianfeng; YEN, Hui-Ling; PEIRIS, Malik; WU, Jie. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens in infected patients. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 12, p. 1177-1179, 2020.

ZOUMPOURLIS, Vassilios; GOULIELMAKI, Maria; RIZOS, Emmanouil; BALIOU, Stella; SPANDIDOS, Demetrios A. The COVID-19 pandemic as a scientific and social challenge in the 21st century. **Molecular Medicine Reports**, v. 22, n. 4, p. 3035-3048, 2020.