



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

YOLIMI MIEKO SAWAZAKI

**Avaliação da estabilidade e atividade antimicrobiana de nanoemulsões contendo o óleo
essencial de *Cinnamomum cassia***

Brasília, DF

2023

YOLIMI MIEKO SAWAZAKI

Avaliação da estabilidade e atividade antimicrobiana de nanoemulsões contendo o óleo essencial de *Cinnamomum cassia*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como parte das exigências para a obtenção do título de Farmacêutico.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Valero da Silva

Brasília, DF

2023

YOLIMI MIEKO SAWAZAKI

Avaliação da estabilidade e atividade antimicrobiana de nanoemulsões contendo o óleo essencial de *Cinnamomum cassia*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como parte das exigências para a obtenção do título de Farmacêutico.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Valero da Silva

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Mônica Valero da Silva
Universidade de Brasília - UnB
e-mail: mvalero2@unb.br

Prof. Dr. Elton Clementino da Silva
Universidade de Brasília - UnB
e-mail: eltonsilva@unb.br

Dedico este trabalho a todas as pessoas que me apoiaram nessa trajetória.

RESUMO

O uso de nanoemulsões no desenvolvimento de cosméticos e medicamentos tem sido estudado com objetivo de melhorar sua eficácia e durabilidade. Os óleos essenciais são compostos voláteis e aromáticos conhecidos e estudados devido sua extensa aplicabilidade e atividades biológicas sendo utilizados no ramo cosmético, industrial, alimentício e farmacêutico. Este trabalho tem como objetivo desenvolver nanoemulsões com óleo essencial de *Cinnamomum cassia* avaliando, portanto, a atividade antimicrobiana do óleo essencial nanoemulsionado e a estabilidade físico-química do sistema. No desenvolvimento das formulações foram empregadas concentrações de 4% e 8% do óleo essencial, com várias combinações de tensoativos não-iônicos, obtendo melhores respostas com o Polissorbato 80 (Tween 80). A formulação de 8% do óleo essencial em temperatura ambiente e 4°C apresentou estabilidade nos ensaios realizados. O óleo essencial puro e em nanoemulsão obtiveram resultados significativos de atividade antimicrobiana, com halos de inibição de 32,6 mm e 19,6 mm para *Staphylococcus aureus* e 31,6 mm e 14,6 mm para *Escherichia coli* respectivamente. Isso demonstra a efetividade do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* livre e nanoemulsionado frente a estes microrganismos.

Palavras-chave: Óleo essencial, *Cinnamomum cassia*, nanoemulsão, estabilidade, atividade antimicrobiana

ABSTRACT

The use of nanoemulsions in the development of cosmetics and medicines has been studied to improve their effectiveness and durability. Essential oils are volatile and aromatic compounds known and studied due to their extensive applicability and biological activities being used in the cosmetic, industrial, food and pharmaceutical manufacturing. This work aims to develop nanoemulsions with *Cinnamomum cassia* essential oil, thus evaluating the antimicrobial activity of the nanoemulsified essential oil and the physical-chemical stability of the system. In the development of the formulations, concentrations of 4% and 8% of the essential oil were used, with various combinations of non-ionic surfactants, obtaining better responses with Polysorbate 80 (Tween 80). The formulation of 8% of the essential oil at room temperature and 4°C showed stability in the tests carried out. The pure essential oil and in nanoemulsion obtained significant results of antimicrobial activity, with inhibition halos of 32.6 mm and 19.6 mm for *Staphylococcus aureus* and 31.6 mm and 14.6 mm for *Escherichia coli* respectively. This demonstrates the effectiveness of free and nanoemulsified *Cinnamomum cassia* essential oil against these microorganisms.

Keywords: Essential oil, *Cinnamomum cassia*, nanoemulsion, stability, antimicrobial activity

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Fenômenos de instabilidade das emulsões.....	16
Figura 2 - Equipamentos utilizados nos métodos de alta energia de emulsificação.....	20
Figura 3 - Representação esquemática do método de preparo da nanoemulsão de Cinnamomum cassia.....	23
Figura 4 - Resultados de pH das formulações NE 5 e NE 6.....	28
Figura 5 - Tamanho de gotícula das formulações NE 5 e NE 6	29
Figura 6 - Índice de polidispersão das formulações NE 5 e NE 6.....	29
Figura 7 - Leitura dos halos de inibição frente aos microrganismos patogênicos empregados	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das nanoemulsões com óleo essencial de <i>Cinnamomum cassia</i>	26
Tabela 2 – Estudo de estabilidade acelerada das nanoemulsões	27
Tabela 3 - Diâmetros de inibição em milímetros (mm).....	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	Revisão da literatura	12
2.1.	Óleo essencial	12
2.1.1.	Propriedades antimicrobianas da <i>Cinnamomum cassia</i>	14
2.2.	Sistemas Dispersos – Emulsões farmacêuticas	15
2.3.	Tensoativos	16
2.4.	Nanoemulsão	17
2.4.1.	Estabilidade da nanoemulsão	17
2.4.2.	Testes de estabilidade para produtos farmacêuticos	18
2.5.	Preparação e formação das Nanoemulsões	19
2.5.1.	Método que utilizam alta energia de emulsificação	19
2.5.2.	Métodos que utiliza baixa energia de emulsificação	20
2.6.	Aplicações das nanoemulsões	20
3	OBJETIVOS	22
3.1.	Objetivo geral	22
3.2.	Objetivos específicos	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1.	Materiais	23
4.2.	Preparo das nanoemulsões	23
4.3.	Avaliação macroscópica	24
4.4.	Estudo de estabilidade acelerada	24
4.4.1.	Cor e odor	24
4.4.2.	Determinação do pH	24
4.4.3.	Centrifugação	24
4.5.	Tamanho de partícula e potencial zeta	24
4.6.	Atividade antimicrobiana	24
4.6.1.	Cepas bacterianas	25

4.6.2.	Preparo do inóculo.....	25
4.6.3.	Teste de difusão em ágar empregando as cepas microbianas <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> ..	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
6	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, estudos com plantas medicinais vêm sendo de grande interesse para países em desenvolvimento, visto que medicamentos fitoterápicos se mostram de certa forma mais seguros e com menor risco de efeitos adversos quando comparados a medicamentos sintéticos (BHINGE et al., 2017). Por possuírem uma certa eficácia em inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, os óleos essenciais oriundos de plantas tornaram-se foco de estudo, se assemelhando a antimicrobianos sintéticos e podendo ainda ser utilizados de forma sinérgica com antibióticos para potencializar o tratamento (SOULAIMANI et al., 2022).

Os óleos essenciais são compostos naturais e altamente voláteis, difundidamente utilizados como aromatizantes, em alimentos, cosméticos, na agricultura e na medicina, em função de suas múltiplas propriedades farmacológicas (TUREK; STINTZING, 2013). O óleo de *Cinnamomum cassia*, espécie pertencente à família *Lauraceae*, é um óleo aromático popularmente conhecido e utilizado como especiaria e na medicina tradicional. Os inúmeros componentes bioativos do óleo, principalmente seu componente mais abundante o cinamaldeído, são responsáveis pelas atividades antimicrobianas, antibacterianas, anti-inflamatórias, antioxidante e anticancerígenas (CHEN et al., 2021; HUANG et al., 2014)

No entanto, devido à estrutura química desses óleos, eles sofrem problemas de instabilidade e degradação, sendo ainda suscetíveis à oxidação quando expostos ao calor e à luz, podendo ser usados por um curto período. Além disso, o uso do OE puro é limitado, pois tendem a ser irritantes e causar alergias quando em contato direto com a pele, além de possuírem baixa solubilidade aquosa resultando consequentemente em baixa biodisponibilidade (KASHYAP et al., 2022; TUREK; STINTZING, 2013).

Nesse sentido, a nanotecnologia pode ser explorada, e o uso de um sistema nanoemulsionado pode ser utilizado para auxiliar nas limitações e problemas de degradação e biodisponibilidade destes óleos. A nanoemulsão (NE) consiste em um sistema disperso de dois líquidos imiscíveis com gotículas de tamanho nanométrico inferior a 500 nm (AULTON; TAYLOR, 2016). Os líquidos imiscíveis se baseiam em uma solução aquosa e uma oleosa, a parte oleosa tem grande importância, pois solubiliza compostos de caráter lipofílico, como os óleos essenciais (RAI et al., 2018). Além dos dois líquidos imiscíveis, para estabilizar esse sistema é fundamental a presença de tensoativos, que são moléculas anfífilas que formam uma interface impedindo a coalescências das gotículas.

As NEs podem encapsular e carregar moléculas irritantes, voláteis e de alto peso molecular impedindo o contato direto e possibilitando aplicações pela via dérmica, protegendo também a integridade do óleo. O tamanho pequeno das gotículas faz com que estas consigam atravessar as membranas biológicas tendo alta permeabilidade nos tecidos, permitindo passagem por capilares finos e aumentando a efetividade do fármaco incorporado. Devido a estas características, as nanoemulsão vem sendo extensamente investigadas como carreadores de fármacos (AULTON; TAYLOR, 2016; KASHYAP et al., 2022; LIANG et al., 2022).

Considerando a aplicabilidade e funcionalidade do sistema nanométrico, o objetivo deste trabalho foi desenvolver nanoemulsões com óleo essencial de *Cinnamomum cassia*, avaliar a sua estabilidade e analisar a atividade antimicrobiana contra bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativa (*Escherichia coli*).

2 Revisão da literatura

2.1. Óleo essencial

Óleo essencial (OE), também chamado de óleo volátil, são óleos aromáticos que podem ser extraídos de várias partes das plantas, geralmente por processos de destilação por arraste de vapor ou hidro destilação. São constituídos por múltiplas substâncias com atividades biológicas distintas, as substâncias em maior concentração caracterizam as propriedades dos óleos essenciais. Em geral, os OEs são compostos por terpenos, principalmente monoterpenos e sesquiterpenos, e por compostos aromáticos derivados do fenilpropano, como fenóis, álcoois e aldeídos (BAKKALI et al., 2008).

Os OEs são extraídos de plantas de várias famílias e gêneros, dentre elas pode-se citar a família *Alliaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Poaceae*, *Rutaceae* e entre outras. Estas famílias comportam plantas com alto valor econômico em decorrência do amplo potencial medicinal dos óleos extraídos (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Os óleos essenciais vêm ganhando interesse de indústrias de cosméticos, perfumes, alimentícia e farmacêutica, devido às diversas possibilidades de aplicações. Dentre as aplicações medicinais, foram relatadas importante atividade no tratamento de câncer, na aromaterapia em massagens, inalação ou aplicação, em distúrbios do sono, contra a covid19 agindo como antivirais, estimulantes da imunidade e anti-inflamatórios, mostram também uso dermatológico com ação antiacne, potencial antioxidante, antifúngico, antimicrobiano e entre outros fins terapêuticos (BHAVANIRAMYA et al., 2019; RANI; SHARMA, 2022).

Entre as variadas atividades farmacológicas dos óleos essenciais, a atividade antimicrobiana se destaca, estando presente em muitas espécies de plantas e apresentando ótimos resultados de inibição do crescimento de microrganismos, tanto Gram-positivos como negativos e contra fungos e leveduras. Em alguns casos podendo ser potenciais fontes para o desenvolvimento de agentes terapêuticos não tóxicos em detrimento das drogas sintéticas utilizadas. Em estudos científicos publicados, significativa atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e negativas, cepas multirresistentes, ação antioxidante, antifúngica e antimicotoxigênica são evidenciadas em espécies de plantas produtoras de óleos essenciais (MUTLU-INGOK et al., 2020). Em um estudo testando diversos OEs contra bactérias resistentes comumente presentes em UTIs, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*, mostraram efetiva resposta antimicrobiana principalmente em bactérias Gram-positivas (MOURAD et al., 2016).

O uso dos óleos essenciais como aditivos naturais alimentares para melhorar a qualidade e a segurança destes também é estudado. Em razão da atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais, estes são capazes de proteger alimentos contra microrganismos patogênicos, deteriorantes e contaminantes que comprometem a segurança do produto, podendo ainda ser empregados em embalagens ativas prolongando a vida útil dos alimentos (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014). Também podem ser usadas na proteção de cultivos agrícolas, como fungicidas para o controle de fungos patogênicos (BHAVANIRAMYA et al., 2019).

O gênero *Cinnamomum* pertencente à família *Lauraceae* é um dos principais gêneros dessa família com significativo valor econômico e medicinal, agrupa cerca de 300 espécies distribuídas pela Ásia, Austrália e ilhas do Pacífico. Muitas das espécies são famosas e conhecidas pelo amplo espectro farmacológico, como a *C. cassia*, *C. verum*, *C. tamala*, *C. camphora*. Possuindo atividade antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, antidiabéticas, entre outras (WANG et al., 2020).

Especificamente a espécie *Cinnamomum cassia*, também conhecida popularmente como canela da china, é uma árvore de folhas perenes, onde a partir da casca de ramos jovens é obtida a canela, uma especiaria culinária e insumo medicinal amplamente cultivada e distribuída na China, Índia e Vietnã. Na medicina tradicional é comumente usada para o tratamento de dispepsia, gastrite, inflamações e distúrbios na circulação sanguínea (CHEN et al., 2021; HUANG et al., 2014).

A *C. cassia* também é uma fonte para extração de óleo essencial. Podendo ser extraído da casca, folhas e galhos, o OE vem sendo estudado e contém 160 componentes já identificados, sendo os principais terpenóides e fenilpropanóides. Os terpenóides são divididos em monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos, são os compostos mais abundantes do OE e possuem importante função biológica, como por exemplo os diterpenos que são imunomoduladores naturais. Os fenilpropanóides são os principais bioativos, contendo majoritariamente cinamaldeído, que pode ser o principal responsável pelos efeitos farmacológicos da *C. cassia* (ZHANG et al., 2019).

Em outros estudos, foram reportadas atividades farmacológicas da *C. cassia* tais como, efeitos antitumorais, neuroprotetores, cardiovasculares, anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, antidiabéticos e antibacterianos (RASOOL et al., 2022; ZHANG et al., 2019). Os efeitos anti-inflamatórios exibiram ação do cinamaldeído em inibir a produção de óxido nítrico e reduzir a

produção de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1 β e IL-6, estas que são encontradas em doenças inflamatórias crônicas (PANNEE; CHANDHANE; WACHAREE, 2014). Na atividade antidiabética, os componentes do extrato de *C. cassia* apresentam propriedades miméticas a insulina podendo ser incorporada no tratamento de diabetes mellitus tipo 1, assim como podem atuar no tratamento da diabetes tipo 2, sendo capaz de reduzir a glicose sérica, triglicérides, colesterol, e melhorar a resistência à insulina (YUN et al., 2018).

O OE das folhas da canela pode atuar em doenças cardiovasculares, possuem ação anticoagulante, são capazes de reduzir o colesterol LDL, melhoram a circulação sanguínea e podem atuar no controle da hipertensão (RASOOL et al., 2022). Além disso, por ser uma matéria prima vegetal, a *C. cassia* apresenta baixa toxicidade, com poucos relatos de reações adversas com o uso clínico (ZHANG et al., 2019).

2.1.1. Propriedades antimicrobianas da *Cinnamomum cassia*

A atividade antimicrobiana da *Cinnamomum cassia* é alvo de pesquisas tendo em vista a gravidade de infecções e agravos à saúde causados por microrganismos patogênicos. Em diversos estudos é comprovada a atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos e parasitas, podem ser utilizada no tratamento de diversas enfermidades.

O OE de *C. cassia* (OECC) mostrou possuir ação antimicrobiana contra um amplo espectro de bactérias. Se mostra eficaz contra patógenos alimentares como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus anginosus* e *Escherichia coli* (HUANG et al., 2014). O OE também tem atividade antifúngica inibindo o crescimento de leveduras como *Candida*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* de fungos filamentosos como *Fusarium solani*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. flavus* e de dermatófitos como *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagraphytes* (OOI et al., 2006). As frações da casca de *C. cassia* mostraram ser ativas contra o protozoário *Leishmania donovani*, podendo ser utilizada sinergicamente de forma concomitante com outros medicamentos para tratar leishmaniose visceral (OZBAK et al., 2019).

Além disso, a *C. cassia* pode ser utilizada contra bactérias formadoras de biofilmes. Os biofilmes são comunidades organizadas de microrganismos situadas dentro de uma matriz polimérica produzida pela própria comunidade. Estes conseguem proteger os microrganismos de agentes externos como antimicrobianos, assim bactérias formadoras de biofilmes podem se tornar resistentes dificultando o tratamento. Nesse sentido, o OE de *C. cassia* mostrou atividade antimicrobiana e antibiofilme contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* e *E.*

coli. Mostrando ainda, que o cinamaldeído contribui essencialmente na atividade antibacteriana e anti-biofilme (FIRMINO et al., 2018).

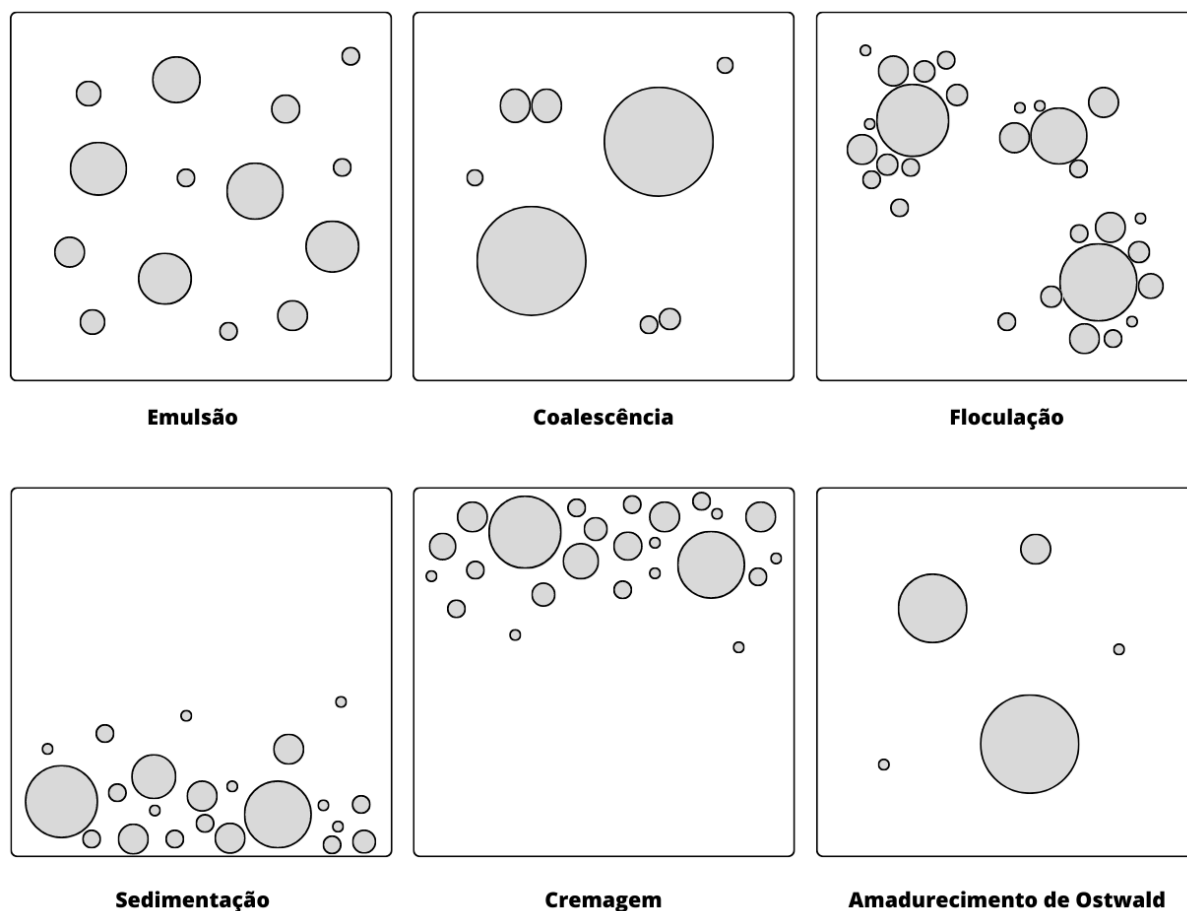
2.2. Sistemas Dispersos – Emulsões farmacêuticas

A emulsificação é importante para a área farmacêutica pois permite preparar misturas homogêneas de líquidos imiscíveis que podem ser administrados por via oral, tópica ou parenteral, tornando agentes terapêuticos irritantes e de difícil absorção mais eficazes e com maior solubilidade (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Uma emulsão consiste em duas fases líquidas imiscíveis e um ou mais tensoativos, empregando, geralmente, uma agitação mecânica. As emulsões líquidas correspondem a uma fase dispersa, que é a fase interna contendo gotículas menores suspensas, e uma fase dispersante, chamada de fase externa ou contínua onde as gotículas estão dispersas. A emulsão em que o óleo está disperso em água é chamada emulsão óleo em água (O/A) o inverso denomina-se emulsão água em óleo (A/O). (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013). Além disso, existem as emulsões múltiplas, onde por exemplo, gotículas de óleo envolvem gotículas de água e estão dispersos em água, formando uma emulsão água-em-óleo-em-água (A/O/A), e de forma correspondente, emulsões óleo-em-água-em-óleo (O/A/O).

A emulsão é considerada um sistema termodinamicamente instável, pois necessita do fornecimento de energia mecânica para se manter emulsionadas. Nesse sentido, o tensoativo ou agente emulsificante comporta-se diminuindo a tensão interfacial criada entre as gotículas dos líquidos imiscíveis, resultando no aumento do tempo de estabilidade das emulsões (AULTON; TAYLOR, 2016). Apesar disso, ao decorrer do tempo as emulsões sofrem fenômeno de instabilidade, que levam a separação das fases, como coalescência, floculação, sedimentação, cremagem e amadurecimento de Ostwald, descritos na Figura 1. A coalescência é a união de duas ou mais gotículas de uma fase formando gotículas maiores de forma irreversível. A floculação é o fenômeno de colisão entre as gotículas que depois se agregam, no entanto, são reversíveis por agitação. Sedimentação e cremagem ocorrem devido a diferença de densidade entre as duas fases levando a migração de uma das substâncias para o topo ou base da emulsão, na cremagem elas se agregam no topo, e na sedimentação as partículas se agregam na base, esse fenômeno ocorre inevitavelmente em emulsões com gotas de maior diâmetro. E o amadurecimento de Ostwald é o fenômeno que resulta no crescimento de gotículas maiores ao longo do tempo (AULTON; TAYLOR, 2016; FRANZOL; REZENDE, 2015).

Figura 1 - Fenômenos de instabilidade das emulsões



Fonte: adaptado de Aulton (2016)

2.3. Tenssoativos

Os agentes tensoativos são moléculas anfifílicas contendo uma porção com características apolares e outra com características polares, capazes de diminuir a tensão interfacial entre duas fases diferentes, como óleo e água. Estes compostos são classificados com base na natureza e carga do grupo presente na parte polar da molécula, podendo ser divididos em aniônicos, catiônicos, não iônicos e anfóteros (BELHAJ et al., 2020).

Os tensoativos aniônicos possuem carga negativa e são os principalmente usados na produção de sabões, sabonetes, xampus e detergentes. Os catiônicos possuem carga positiva e são uma classe menor, e tem em sua estrutura um nitrogênio quaternário. Os tensoativos não iônicos não possuem nenhuma carga, são muito utilizados no mercado, e diferente do catiônico e aniônico suas propriedades físico-químicas são menos sensíveis a eletrólitos. Os tensoativos anfóteros podem apresentar tanto carga positiva quanto negativa, dependendo do pH do meio.

Se comportam como aniônicos em meio alcalino e como catiônicos em meio ácido, no entanto são pouco utilizados devido ao alto custo (DALTIM, 2011).

Os tensoativos não iônicos são muito utilizados para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e cosméticos, possuem vantagens em comparação aos demais por serem geralmente menos tóxicos, menos irritantes para pele e tendem a manter o pH fisiológico. Entre os tensoativos não iônicos utilizados para solubilização de óleos essenciais em soluções aquosas podemos citar, os ésteres de sorbitado (Spans), e os ésteres de polioxietileno-sorbitano, os polissorbatos (Tweens). Estes tensoativos são utilizados para formar emulsões estáveis a depender do seu equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL). O EHL é um parâmetro importante para determinar a escolha do tensoativo, estes com EHL mais baixos estabilizam emulsões A/O, e com EHL mais altos estabilizam emulsões O/A (AULTON; TAYLOR, 2016; KUMAR; RAJESHWARRAO, 2011; PICHOT; SPYROPOULOS; NORTON, 2010).

2.4. Nanoemulsão

A nanotecnologia se baseia no desenvolvimento tecnológico de produtos em escala nanométrica. Atualmente vem aumentando o uso dessa tecnologia para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e medicamentos, os chamados nanofarmacêuticos. Tendo como exemplo nanoemulsão, nanossuspensões, nanoesferas, entre outros. Nesse sentido, as nanoemulsões vêm sendo estudadas e se mostram promissoras para as áreas de cosméticos, diagnósticos, terapias medicamentosas e biotecnologias (SHAH; BHALODIA; SHELAT, 2010).

As nanoemulsões (NE) são dispersões de gotículas com um diâmetro inferior a ~500 nm ($0,5 \mu\text{m}$), conferindo um aspecto claro ou translúcido. O termo nanoemulsão é muitas vezes intercambiável com o termo microemulsão, no entanto possuem diferentes aspectos estruturais e estabilidade termodinâmica a longo prazo (SINGH et al., 2017). As NEs são dispersões termodinamicamente instáveis de óleo e água que se formam de forma mecânica, enquanto as microemulsões são dispersões isotrópicas termodinamicamente estáveis que se formam de forma espontânea (KALE; DEORE, 2016).

2.4.1. Estabilidade da nanoemulsão

É considerada uma emulsão estável aquela que é cineticamente estável, em que as gotas permanecem dispersas e com seu caráter original, e mantém suas características de aparência, odor e apresenta-se livre de contaminações ao decorrer de todo período estudado de estabilidade (AULTON; TAYLOR, 2016).

As emulsões são termodinamicamente instáveis, tendo a tendência das fases se separarem ao longo do tempo. Isso é dado por dois mecanismos: floculação seguida principalmente por coalescência, e amadurecimento de Ostwald. Esse processo ocorrerá naturalmente, a menos que a emulsão seja cineticamente estabilizada por emulsificantes. Já as nanoemulsões, estas são caracterizadas por ter grande estabilidade em suspensão devido ao seu tamanho muito pequeno, são sistemas termodinamicamente instáveis, no entanto são cineticamente estáveis. Estes aspectos contribuem para uma resistência a fenômenos de instabilidade como a floculação e sedimentação. Nesse sentido, a instabilidade das nanoemulsões se dá sobretudo pelo amadurecimento de Ostwald e pela coalescência das gotas (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; SINGH et al., 2017).

O amadurecimento de Ostwald é um fenômeno que consiste no crescimento do raio da gotícula, aumentando progressivamente até ocasionar a separação das fases. No entanto estes processos podem ser evitados ou retardados, em alguns estudos são empregadas misturas lipídicas de MCT (triglicerídeos de cadeia média) para retardar o amadurecimento de Ostwald. E a utilização de um surfactante mais hidrofílico impediria o fenômeno de coalescência (SINGH et al., 2017).

2.4.2. Testes de estabilidade para produtos farmacêuticos

Os testes de estabilidade de produtos farmacêuticos avaliam os efeitos de fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz, e propriedades físico-químicas dos compostos ativos e excipientes de modo a determinar a vida útil e condições adequadas de armazenamento do produto (POKHARANA et al., 2018).

Conforme estabelecido na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os testes de estabilidade são distribuídos principalmente em estudo de estabilidade acelerado, estudo de estabilidade de acompanhamento, estudo de estabilidade de longa duração e estudo de estabilidade em uso. O estudo de estabilidade acelerado avalia alterações físicas, químicas e microbiológicas de um produto em condições forçadas e armazenamento. O estudo de estabilidade de longa duração verifica as características físicas, químicas e microbiológicas do produto durante o prazo de validade proposto. O estudo de estabilidade de acompanhamento é feito para verificar se as características do produto se mantêm conforme o prazo de validade. O estudo de estabilidade em uso é feito para embalagens multidoses, como pomadas e cremes, para verificar se após abertura e reaberturas o produto se mantém estável no prazo proposto (BRASIL, 2019)

Durante todos os estágios de desenvolvimento dos produtos farmacêuticos são realizadas avaliações de estabilidade. Em estágios iniciais de desenvolvimento são feitos estudos de estabilidade acelerada, a fim de avaliar a estabilidade do produto em condições de estresse. São feitos estudos de degradação forçada, com intuito de identificar mecanismos de degradação, tais como variação da temperatura, oxidação, degradação por luz e hidrólise devido variação de pH. Para prever o período de vida útil do produto em temperatura de armazenamento real, o produto é armazenado em diferentes temperaturas incluindo temperaturas mais altas, junto a isso, são aplicadas condições de estresse umidade, luz, pH e gravidade. Também é feito o teste de ciclo de temperatura, que envolve o armazenamento alternado em altas e baixas temperaturas, seguindo ciclos de congelamento e descongelamento que aceleram a deterioração no produto (AULTON; TAYLOR, 2016; SILVA et al., 2009).

2.5. Preparação e formação das Nanoemulsões

O método de preparo das nanoemulsões é escolhido de acordo com a natureza das substâncias encapsuladas e via de administração de escolha. Além disso, para o preparo de uma nanoemulsão, a seleção dos emulsificantes, a concentração adequada, a ordem de adição das substâncias, a velocidade de agitação e temperatura são pontos importantes no processo (RAI et al., 2018). Os sistemas nanoemulsionados podem ser formados a partir de métodos que utilizam alta energia e os que utilizam de baixa energia de emulsificação.

2.5.1. Método que utilizam alta energia de emulsificação

As técnicas de alta energia exigem um nível alto de energia para conseguir quebrar a força intermolecular e ligações entre os líquidos e gerar gotículas menores de tamanho manométrico. Essa energia geralmente é provinda de cisalhamento, ondas ultrassônicas e pressão. As técnicas de alta energia são: Homogeneização de válvula de alta pressão, microfluidização e ultrasonicação.

A homogeneização é um processo que através de um misturador de alto cisalhamento em alta pressão, que força uma emulsão grosseira de água, óleo e emulsificante a se quebrarem em partículas menores. A microfluidização consiste em vários canais estreitos que fazem a emulsão colidir entre si e com as paredes do dispositivo, gerando turbulência e forças de cisalhamento. A ultrasonicação gera ondas de alta pressão e frequência capazes de formar nanomulsões ou reduzir as partículas de emulsões pré-formadas. (OZOGUL et al., 2022; RAI et al., 2018; SINGH et al., 2017).

Figura 2 - Equipamentos utilizados nos métodos de alta energia de emulsificação



Fonte: Hielscher (2019); Altmann (2022); IKA (2018)

2.5.2. Métodos que utiliza baixa energia de emulsificação

As técnicas de baixa energia utilizam a energia interna do sistema que é liberada a partir da transição de fases do tensoativo, formando gotículas menores. São divididas em dois métodos principais: o método de temperatura de inversão de fases (PTI) e o método de composição de inversão de fase (PIC) (DA SILVA et al., 2022).

O método de temperatura de inversão de fases se fundamenta na mudança de solubilidade do surfactante com a temperatura. Utiliza-se a transição de fase que ocorre em decorrência da mudança de temperatura da solução, essa temperatura de transição é chamada de temperatura de inversão de fase (PIT). A mudança de temperatura afeta o valor geral do equilíbrio hidrofílico-lipofílico das NEs, abaixo do PIT o surfactante é hidrofílico favorecendo a solubilidade em água, acima do PIT acontece o inverso (OZOGUL et al., 2022; TAYEB; SAINSBURY, 2018). No método de composição de inversão de fase a transição de fase do surfactante é induzida por mudanças na composição do sistema, em temperatura constante. As mudanças na composição estão relacionadas com alteração na solubilidade do sistema, adicionando um componente (água ou óleo) sobre a mistura dos outros, por exemplo em uma emulsão A/O é adicionado água progressivamente até ser formada uma emulsão O/A (OZOGUL et al., 2022; SOLANS; SOLÉ, 2012).

2.6. Aplicações das nanoemulsões

As nanoemulsões são importantes veículos de fármacos e componentes ativos. Podem ser aplicadas em vários campos, principalmente nas áreas de cosméticos, alimentos e farmacêutica. Na área alimentícia, elas podem ser aplicadas em alimentos para reduzir as

mudanças sensoriais que acontecem ao longo do tempo, e aumentar a vida útil e segurança do produto, possibilitando a incorporação de ativos que agem como conservantes (DA SILVA et al., 2022).

Na produção de cosméticos, as NEs atuam como nanocarreadores dos ingredientes ativos para camadas específicas da pele, podendo ser utilizadas pela via transdérmica. Devido ao tamanho das nanopartículas, estas facilitam a permeação cutânea e melhoram a estabilidade dos componentes da formulação (SHAH; BHALODIA; SHELAT, 2010). Também podem melhorar a absorção e eficácia de fármacos administrados por via oral, prolongando a resistência destes à degradação no trato gastrointestinal. Podem ainda, ser usados na forma de aerossóis e na forma injetável em aplicações parenterais e vacinas (TAYEB; SAINSBURY, 2018).

O uso das nanoemulsões no tratamento de infecções bacterianas é explorado, elas conseguem permear a parede celular das bactérias, entregar o fármaco e destruir a membrana celular, mostrando uma boa resposta antimicrobiana (LIANG et al., 2022). O uso de nanoemulsões para carregar óleo essencial de origem vegetal também é reportado, tendo em vista as características lipofílicas dos OEs, o sistema nanoemulsionado é um dos mais utilizados, melhorando a solubilidade aquosa dos óleos. A atividade antimicrobiana de OEs incorporados em nanoemulsões foi testada em um estudo, mostrando melhores resultados de inibição bacteriana em comparação com o OE isolado (SOULAIMANI et al., 2022).

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver um sistema disperso do tipo nanoemulsão incorporando o óleo essencial de *Cinnamomum cassia*, na fase dispersa do sistema.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial *Cinnamomum cassia*, frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.
- Desenvolver uma nanoemulsão estável com óleo essencial de *Cinnamomum cassia*
- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial *Cinnamomum cassia* nanoemulsionado em sistema disperso O/A, frente as cepas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.
- Analisar a estabilidade acelerada das nanoemulsões com o óleo essencial de *Cinnamomum cassia*

4 MATERIAIS E MÉTODOS

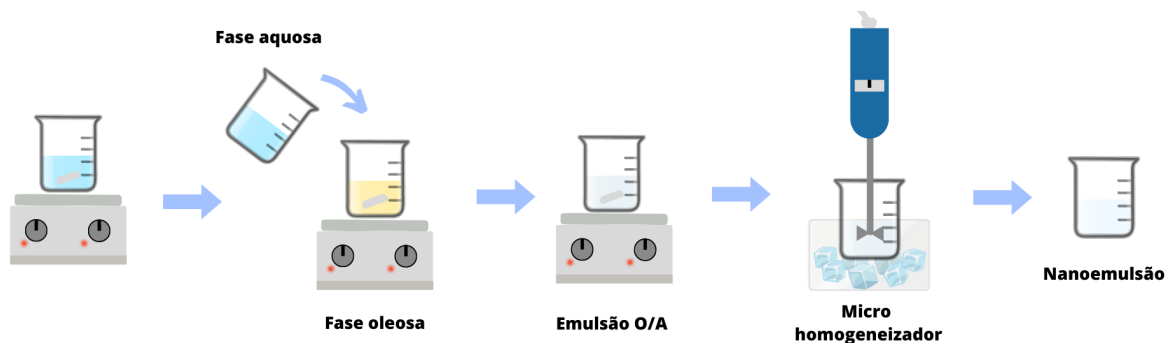
4.1. Materiais

O óleo essencial testado de canela (*Cinnamomum cassia*) foi adquirido da FERQUIMA®, o tensoativo polissorbato 80 (Tween 80) foi adquirido da Dinâmica®, e os equipamentos utilizados para o preparo da formulação, agitador magnético GT-AMB10L GLOBAL TRADE®, balança semi analítica 3200G MogGlass® e Micro Homogeneizador MA1102 MARCONI®. Para a análise de pH foram utilizadas tiras indicadoras de pH MQuant® e para centrifugação utilizou-se a centrífuga SPINPLUS TITAN DAIKI®. O acondicionamento das amostras foi feito utilizando estufa de cultura bacteriológica SolidSteel® e estufa bacteriológica Q316 QUIMIS®.

4.2. Preparo das nanoemulsões

O método de alta energia de emulsificação com micro homogeneizador foi utilizado para preparar a nanoemulsão (O/A). A solução aquosa de tensoativo tween 80 (5%v/v) e água destilada, foi deixada em agitação constante em agitador magnético (GLOBAL TRADE TECNOLOGY®) em aquecimento até atingir 70 °C. A solução oleosa consistiu no óleo essencial de *Cinnamomum cassia* em concentrações de 4% e 8%, mantidos em agitação magnética, até atingir a temperatura de 40°C. Em seguida verte-se a fase aquosa (FA) sobre a fase oleosa (FO) com auxílio de bastão de vidro, posteriormente foi deixado em agitação constante por 2 minutos em 1140 rpm. Formada a emulsão leva-se ao micro homogeneizador (MARCONI®) por 5 minutos a 30.000 rpm em banho de gelo para a formação da nanoemulsão. O método utilizado foi baseado em trabalhos publicados previamente (DA SILVA, 1997; KLEINUBING et al., 2021; KREUTZ et al., 2021; TIAN et al., 2021).

Figura 3 - Representação esquemática do método de preparo da nanoemulsão de *Cinnamomum cassia*



Fonte: Autoria própria (2023)

4.3. Avaliação macroscópica

Esta avaliação foi realizada após 24 horas do preparo das amostras, observando a presença de sinais de instabilidade na formulação, como separação de fases, aspecto turvo ou precipitação. Em caso do não surgimento dos sinais de instabilidade inicia-se o teste de estabilidade acelerada.

4.4. Estudo de estabilidade acelerada

O estudo de estabilidade acelerada foi conduzido analisando as amostras acondicionadas em temperatura ambiente, em 40°C e 4°C, avaliando parâmetros de cor, odor, aspecto, homogeneidade e separação de fases. Também foi verificado o pH das formulações e a centrifugação. Todas as avaliações foram realizadas periodicamente em 24h, 7 dias, 15 dias e 60 dias.

4.4.1. Cor e odor

Foi observada a coloração da amostra após o preparo, observando aspectos azulados característicos de nanoemulsões. O odor da amostra foi analisado diretamente através do olfato. Foram observados a coloração e odor em todos os períodos pré-estabelecidos do estudo.

4.4.2. Determinação do pH

O pH das amostras foi analisado em temperatura ambiente utilizando as tiras indicadoras de pH MQuant®. A tira de pH foi umedecida com um volume transferido com um bastão de vidro.

4.4.3. Centrifugação

O teste de centrifugação foi realizado utilizando 5 mL de cada amostra e centrifugando por 15 minutos em 3.000 rpm em centrífuga SPINPLUS TITAN DAIKI®.

4.5. Tamanho de partícula e potencial zeta

O tamanho das gotículas, PDI e potencial zeta também foram avaliados nos períodos pré-estabelecidos. Antes do início da análise as amostras foram diluídas em água destilada em uma proporção de 1:10. O diâmetro médio das partículas (nm), o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta (mV) das amostras foram determinados utilizando método de dispersão de luz dinâmica do Zetasizer Nano ZS (Malvern®), os resultados foram medidos em temperatura ambiente.

4.6. Atividade antimicrobiana

4.6.1. Cepas bacterianas

As cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* (INCQS 00402) e *Escherichia coli* (INCQS 00379), foram obtidas por doação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde e testadas quanto à susceptibilidade ao OE de *Cinnamomum cassia* (Ferquima-SP).

4.6.2. Preparo do inóculo

A suspensão microbiana foi padronizada utilizando a escala 1,0 Mc Farland ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), transferindo uma alíquota de um repique jovem de cada bactéria testada, para tubos com solução salina 0,9% estéril, até atingir a turbidez da escala.

4.6.3. Teste de difusão em ágar empregando as cepas microbianas *E. coli* e *S. aureus*

A atividade antimicrobiana dos OEs foi determinada utilizando o ensaio de difusão em ágar empregando disco de papel de 0,6 mm estéril. A técnica consistiu no preparo de placas de Petri em triplicata com 25 mL de meio de cultura ágar Mueller Hinton (MHA) estéril para cada bactéria desafiada. Após solidificação do meio MHA, transferiu-se 0,3 ml (300 μ L) da suspensão microbiana padronizada (10^8 UFC/mL) para a monocamada do meio solidificado espalhando sobre a superfície com o auxílio de swab estéril. Os discos de papel estéreis foram transferidos, com auxílio de pinça estéril, para as triplicatas de placas, utilizando em todas as placas o disco do padrão, Gentamicina (Diagnósticos microbiológicos especializados - DME) e os discos com 20 μ L do OE. Em outras triplicatas de placas foram colocados discos com 20 μ L da formulação sem o OE, discos com 20 μ L das formulações nas concentrações 4% e 8% e o padrão. As placas foram incubadas em estufa à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. A atividade antimicrobiana foi avaliada a partir da leitura do diâmetro do halo de inibição ao redor dos discos, com auxílio de uma régua milimetrada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram desenvolvidos, no decorrer do trabalho, nanoemulsões compostas de óleo essencial, com concentrações estabelecidas em 4 e 8% e combinações de tensoativos, assim como, variações nas técnicas de fabricação, conforme apresentado na Tabela 1.

De acordo com a Tabela 2 é possível observar que as formulações não se apresentaram estáveis quando a temperatura de acondicionamento foi de 40°C, isso corrobora com o fato da mesma influenciar de forma significativa na estabilidade do sistema disperso como um todo, conforme é mencionado em outros trabalhos publicados (YULIANI; MUCHTADI; SYAKIR, 2018). Por outro lado, em temperatura de geladeira (+/-4°C) todas as amostras permaneceram estáveis durante o período total de avaliação (60 dias), indicando que esta seria a temperatura ideal para a conservação da nanoemulsão.

Tabela 1 - Composição das nanoemulsões com óleo essencial de *Cinnamomum cassia*

Formulação	OE (%)	Tensoativos (%)				H2O (%)
		Tween 20	Tween 80	Span 20	Span 80	
NE 1	4	5	-	-	-	91
NE 2	8	5	-	-	-	87
NE 3	4	4,75	-	0,25	-	91
NE 4	4	4,5	-	0,5	-	91
NE 5	4	-	5	-	-	91
NE 6	8	-	5	-	-	87
NE 7	4	4,925	-	-	0,0075	91
NE 8	4	-	10	-	-	86
NE 9	4	-	9,85	-	0,15	86

Tabela 2 - Estudo de estabilidade acelerada das nanoemulsões

Formulação	Tempo	Centrifugação	TA	4°C	40°C	pH	Tamanho (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
NE 1	24 h	ES	ES	ES	ES	4,5	419,0	0,214	-13,9
	7 dias	IN	ES	ES	IN	4,5	487,3	0,120	-15,6
	15 dias	-	IN	ES	-	4,5	-	-	-
	60 dias	-	-	-	-	-	-	-	-
NE 2	24 h	ES	ES	ES	ES	4,5	30,32	0,229	-5,18
	7 dias	IN	ES	ES	IN	4,5	127	0,271	-12,3
	15 dias	-	IN	ES	-	4,5	-	-	-
	60 dias	-	-	-	-	-	-	-	-
NE 3	24 h	IN	-	-	-	5	400,7	0,112	-14
	7 dias	-	-	-	-	-	-	-	-
	15 dias	-	-	-	-	-	-	-	-
	60 dias	-	-	-	-	-	-	-	-
NE 4	24 h	IN	-	-	-	5	281,8	0,273	-16,3
	7 dias	-	-	-	-	-	-	-	-
	15 dias	-	-	-	-	-	-	-	-
	60 dias	-	-	-	-	-	-	-	-
NE 5	24 h	ES	ES	ES	ES	4,5	144,4	0,321	-8,04
	7 dias	ES	ES	ES	IN	4,5	181,2	0,374	-6,93
	15 dias	IN	IN	ES	-	4,5	297,1	0,315	-7,42
	60 dias	-	-	ES	-	4,5	-	-	-
NE 6	24 h	ES	ES	ES	ES	3,5	14,09	0,220	-4,23
	7 dias	ES	ES	ES	ES	3,5	16,55	0,218	0,203
	15 dias	ES	ES	ES	IN	3,5	24,23	0,220	-1
	60 dias	IN	ES	ES	-	3,5	26,86	0,227	-4
NE 7	24 h	IN	-	-	-	4	563,9	0,231	-13,2
	7 dias	-	-	-	-	-	-	-	-
	15 dias	-	-	-	-	-	-	-	-
	60 dias	-	-	-	-	-	-	-	-
NE 8	24 h	IN	-	-	-	5	-	-	-
	7 dias	-	-	-	-	-	-	-	-
	15 dias	-	-	-	-	-	-	-	-
	60 dias	-	-	-	-	-	-	-	-
NE 9	24 h	IN	-	-	-	5	-	-	-
	7 dias	-	-	-	-	-	-	-	-
	15 dias	-	-	-	-	-	-	-	-
	60 dias	-	-	-	-	-	-	-	-

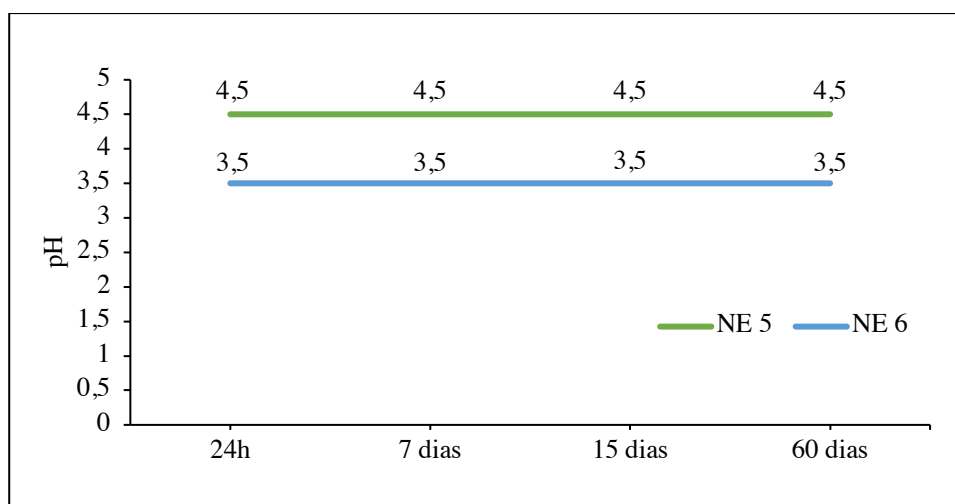
ES: Estável; IN: instável; PDI: índice de polidispersão

Dentre as formulações testadas, algumas apresentaram instabilidade em 24 horas após a fabricação, evidenciada no teste de centrifugação, com isso, diante dos resultados de estabilidade em temperatura ambiente e centrifugação, foram escolhidos, para seguir com o estudo de estabilidade e atividade antimicrobiana, as formulações NE5 e NE6.

O estudo de estabilidade das nanoemulsões a 4% (NE5) e 8% (NE6) de óleo essencial mostraram, em um contexto geral, uma melhor resposta no que se refere a estabilidade para a formulação com 8% de OECC. Nas condições de temperatura ambiente a formulação NE6 mostrou-se estável até 60 dias, enquanto a formulação NE5 apresentou instabilidade com 15 dias.

Não foram constatadas alterações na cor e odor das nanoemulsões durante o período de análise. Em avaliação macroscópica as NEs apresentaram odor característico e coloração branca com aspecto leitoso, podendo-se observar um aspecto azulado. O pH das formulações não apresentaram variações relevantes durante o período de acondicionamento, a formulação com 4% teve pH ligeiramente mais alto em torno de 4,5, e a de 8% com pH 3,5, conforme é possível observar na Tabela 2 e Figura 4. O pH é um parâmetro que pode indicar a instabilidade de um sistema disperso, variações no pH, como sua redução, podem sinalizar sinais de degradação provinda do tensoativo.

Figura 4 - Resultados de pH das formulações NE 5 e NE 6



As duas formulações testadas NE5 com 4% de OE e NE6 com 8%, como mostrados na Tabela 2 e Figura 5 e 6, obtiveram tamanho das partículas e valores de PDI baixos, indicando gotículas nanométricas com tamanhos uniformes. Contudo, a formulação a 8% apresentou os

melhores resultados, tanto em tamanho de gotículas com variação de 14,09 - 26,86 nm, quanto em PDI variando de 0,220 - 0,227. O tamanho das gotículas e o PDI afetam diretamente a estabilidade da nanoemulsão, gotículas menores são menos propensas a sofrerem fenômenos de instabilidade. O PDI é um parâmetro que refere à heterogeneidade do tamanho das gotas, dessa forma valores de PDI próximos a zero refletem redução da heterogeneidade do sistema, e próximos a 1 tamanhos heterogêneos (HUANG et al., 2020). Além disso, partículas pequenas e baixos valores de PDI mostram-se mais resistentes ao amadurecimento de Ostwald.

Figura 5 - Tamanho de gotícula das formulações NE 5 e NE 6

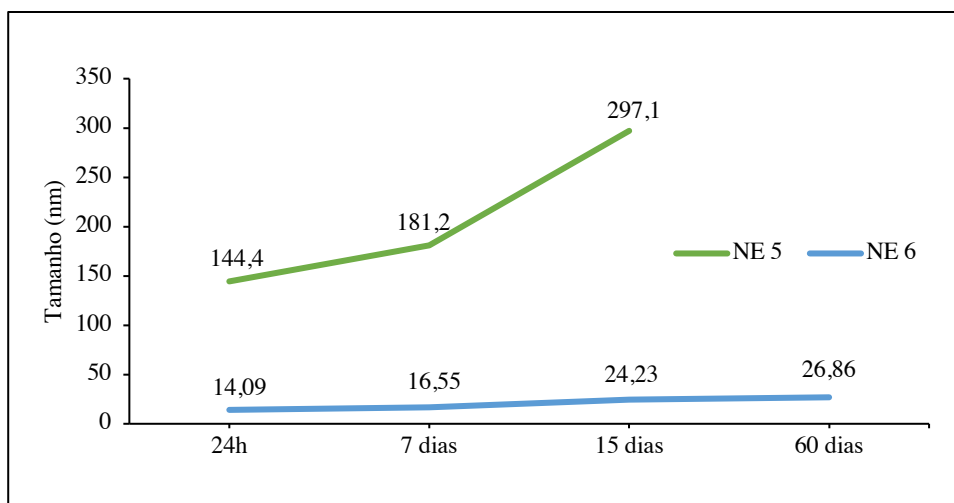
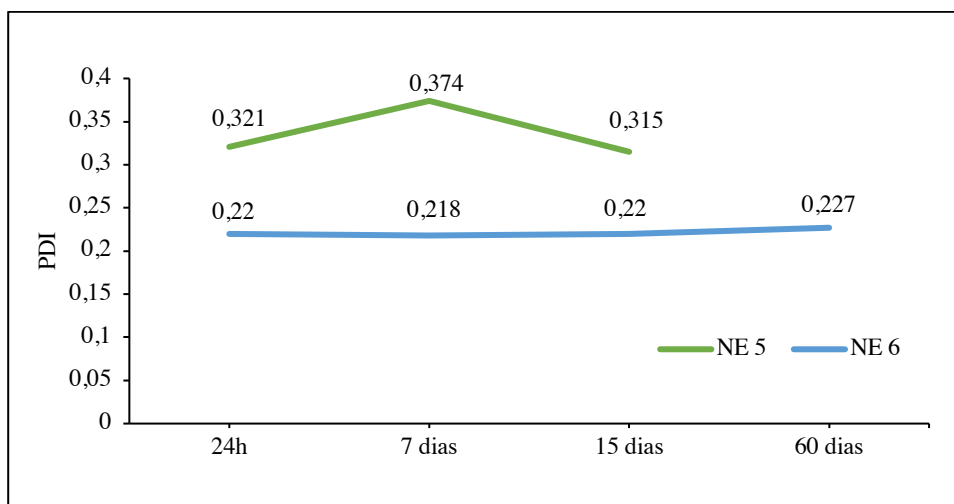


Figura 6 - Índice de polidispersão das formulações NE 5 e NE 6



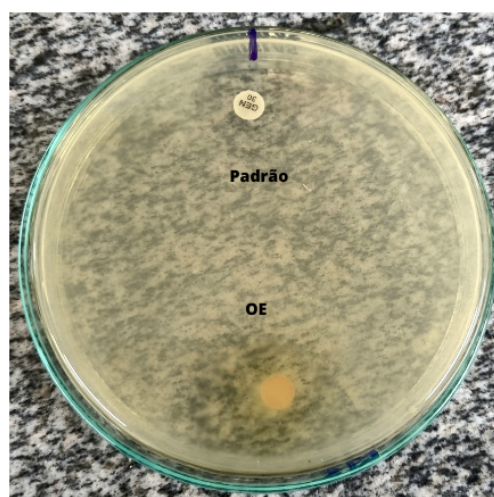
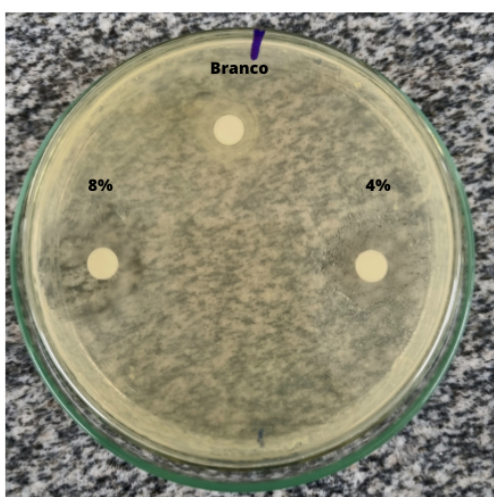
O potencial zeta das nanoemulsões sofreu algumas variações, na formulação NE5 variou de -6,93 a -8,04 e na formulação NE6, apresentou valores ainda mais baixos de 0,203 a -4,23. Além disso, os valores no 60º dia da NE5 não foram medidos, pois esta havia separado. O potencial zeta pode ser considerado um indicador de estabilidade eletrostática do sistema emulsionado, esse parâmetro mede a interação eletrostática das cargas entre as gotículas. Em

geral, um potencial zeta alto reflete maior estabilidade ao sistema, sendo considerado sistemas relativamente estáveis com valores acima de 30 mV, este valor sendo positivo ou negativo (LIANG et al., 2022). Valores mais baixos do potencial zeta podem levar a sinais de instabilidade como floculação, nesse sentido os resultados encontrados no experimento mostram necessidade de ajustes farmacotécnicos.

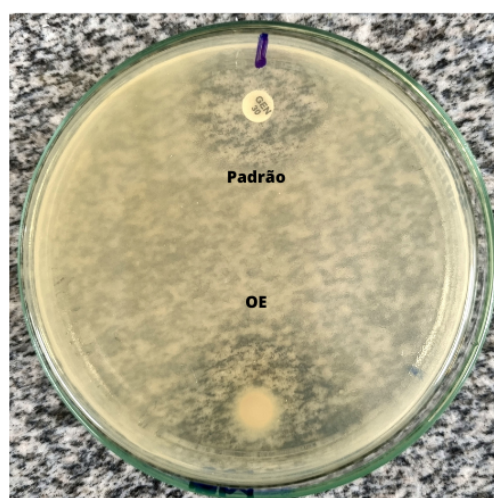
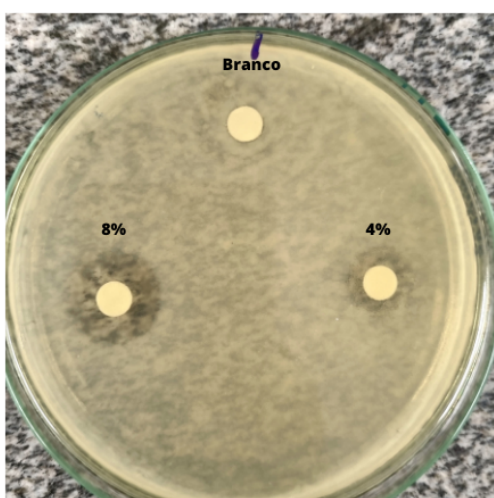
Os resultados da atividade antimicrobiana do OE de *C. cassia* em 4% e 8% foram avaliados, apresentando halos de inibição que podem ser verificados na Tabela 3 e visualizados na Figura 4, em que M1 se refere as placas semeadas com *Staphylococcus aureus*, e M2 as placas com *Escherichia coli*.

Figura 7 - Leitura dos halos de inibição frente aos microrganismos patogênicos empregados

M1



M1



Fonte: Autoria própria (2023)

As medidas dos halos de inibição estão descritas na Tabela 3, com valores expressos em média. As duas formulações mostraram resultados relevantes contra os dois microrganismos testados, a formulação NE6 apresentou diâmetros de inibição de 19,6 mm e 14,6 mm, e a formulação NE5 obteve halos de 11,6 mm e 11 mm, para *S. aureus* e *E. coli* respectivamente. Este resultado reflete que o óleo essencial mesmo encapsulado num sistema disperso do tipo nanoemulsão, mostrou resultados expressivos, reforçando atividade antimicrobiana do *Cinnamomum cassia*.

Tabela 3 - Diâmetros de inibição em milímetros (mm)

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
OE	32,6	31,6
NE5	11,6	11,0
NE6	19,6	14,6
Gentamicina	23,0	25,6

NE5 com 4% de óleo essencial; NE6 com 8% de óleo essencial

Além disso, a ação antimicrobiana das duas formulações frente a *S. aureus* foi melhor em comparação com *E. coli*. Em geral, vários óleos essenciais são relatados mais ativos contra Gram-positivas que Gram-negativas, isso pode ser explicado pela estrutura da parede celular das bactérias Gram-negativas, que dispõem de uma fina camada de peptidoglicano e é constituída essencialmente pela camada de lipopolissacarídeo (LPS). Por ter uma estrutura mais complexa que Gram-positivos, além de dificultar a entrada de agentes antimicrobianos dentro da célula bacteriana, o LPS presente na parede evita o acúmulo de óleos na membrana celular (OUSSALAH et al., 2007).

Os resultados de inibição do OE de *C. cassia* na forma livre obtiveram resultados superiores a forma nanoemulsionada e ao padrão empregado, com valores de 32,6 e 31,6 para *S. aureus* e *E.coli* respectivamente. Esse resultado diverge com o que foi encontrado por Liang (2022), onde o diâmetro de inibição da nanoemulsão contendo o óleo essencial foi de 18,33 e 18,17 e somente o OE foi de 15,00 e 14,00 para *S. aureus* e *E.coli*.

Apesar das dificuldades encontradas em obter um sistema disperso estável por um período de 60 dias de avaliação, o óleo essencial de *Cinnamomum cassia*, apresentou resultados positivos no que abrange a atividade antimicrobiana tanto na forma livre como na forma nanoemulsionada, com halos de inibição próximos ou superiores ao padrão empregado para *S.*

aureus e *E. coli*, reforçando o seu valor medicinal como um Insumo Farmacêutico Ativo (IFA). Para o emprego em formulações para uso em unidades de saúde, indústrias de medicamentos, cosméticos e alimentos no combate a contaminações microbianas e formações de biofilmes comuns nesses estabelecimentos, por uso de insumos vegetais, minerais, animais e água, que são fontes para proliferação de microbiotas patogênicas.

6 CONCLUSÃO

Nos experimentos realizados, verificou-se que ambas as formas do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* apresentaram atividade antimicrobiana, com o óleo essencial em sua forma livre mostrando inibição de crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, com resultados superiores ao padrão empregado (gentamicina), um antimicrobiano comum em hospitais. Além disso, as nanoemulsões apresentaram boa estabilidade na temperatura de 4°C, mas requerem ajustes farmacotécnicos para melhorar sua estabilidade.

Conclui-se que o sistema disperso da nanoemulsão é promissor para a encapsulação de óleos essenciais com o objetivo de inibir o crescimento microbiano das duas cepas estudadas. No entanto, são necessários mais estudos para desenvolver uma formulação com resultados mais promissores em termos de estabilidade físico-química por períodos superiores a 60 dias, assim como ampliar a concentração do óleo essencial para verificar se a ação antimicrobiana da forma nanoencapsulada será superior aos valores encontrados no estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 9. ed. São Paulo: ARTMED, 2013.
- ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, p. 185–199, 24 jun. 2008.
- AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. **Aulton delineamento de formas farmacêuticas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 1 fev. 2008.
- BELHAJ, A. F. et al. The effect of surfactant concentration, salinity, temperature, and pH on surfactant adsorption for chemical enhanced oil recovery: a review. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, v. 10, n. 1, p. 125–137, 1 jan. 2020.
- BHAVANIRAMYA, S. et al. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 49–55, 1 jun. 2019.
- BHINGE, S. D. et al. Formulation development and evaluation of antimicrobial polyherbal gel. **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v. 75, n. 5, p. 349–358, 1 set. 2017.
- CHEN, G. et al. Enhanced extraction of essential oil from *Cinnamomum cassia* bark by ultrasound assisted hydrodistillation. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 36, p. 38–46, 1 ago. 2021.
- DA SILVA, B. D. et al. Essential oil nanoemulsions: Properties, development, and application in meat and meat products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 121, p. 1–13, 1 mar. 2022a.
- DA SILVA, B. D. et al. Essential oil nanoemulsions: Properties, development, and application in meat and meat products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 121, p. 1–13, 1 mar. 2022b.
- DA SILVA, M. V. **Determinação do EHL crítico do óleo de babaçu, avaliação da função hidratante e aplicação em emulsões tópicas como novo adjuvante lipofílico**. Mestrado em ciências farmacêuticas—Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1997.
- DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. . Acesso em: 16 jan. 2023.
- FIRMINO, D. F. et al. Antibacterial and Antibiofilm Activities of *Cinnamomum* Sp. Essential Oil and Cinnamaldehyde: Antimicrobial Activities. **The Scientific World Journal**, v. 2018, p. 1–9, 6 jun. 2018.
- FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**, v. 25, p. 1–9, 1 dez. 2015.
- HUANG, D. F. et al. Chemical constituents, antibacterial activity and mechanism of action of the essential oil from *Cinnamomum cassia* bark against four food-related bacteria. **Microbiology (Russian Federation)**, v. 83, n. 4, p. 357–365, 1 jul. 2014.
- HUANG, M. et al. Effects of nanoemulsion-based edible coatings with composite mixture of rosemary extract and ϵ -poly-l-lysine on the shelf life of ready-to-eat carbonado chicken. **Food Hydrocolloids**, v. 102, p. 105576, 1 maio 2020.
- KALE, S. N.; DEORE, S. L. Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 8, n. 1, p. 39–47, 19 nov. 2016.
- KASHYAP, N. et al. Prospects of essential oil loaded nanosystems for skincare. **Phytomedicine Plus**, v. 2, n. 1, p. 100198, 1 fev. 2022.
- KLEINUBING, S. A. et al. Hyaluronic acid incorporation into nanoemulsions containing *Pterodon pubescens* Benth. Fruit oil for topical drug delivery. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 32, p. 101939, 1 mar. 2021.

- KREUTZ, T. et al. Aniba canelilla (Kunth) Mez essential oil-loaded nanoemulsion: Improved stability of the main constituents and in vitro antichemotactic activity. **Industrial Crops and Products**, v. 171, p. 113949, 1 nov. 2021.
- KUMAR, G. P.; RAJESHWARRAO, P. Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery—an overview. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 1, n. 4, p. 208–219, 1 dez. 2011.
- LIANG, D. et al. Preparation, characterization, and biological activity of Cinnamomum cassia essential oil nanoemulsion. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 86, p. 106009, 1 maio 2022.
- MOURAD, M. H. et al. Antibacterial activity of certain medicinal plant and their essential oils on the isolated bacteria from UTI patients. **International Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 12, p. 1510–1530, 31 dez. 2016.
- MUTLU-INGOK, A. et al. Antibacterial, Antifungal, Antimycotoxigenic, and Antioxidant Activities of Essential Oils: An Updated Review. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 20, 1 out. 2020.
- OOI, L. S. M. et al. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb Cinnamomum cassia Blume. **The American journal of Chinese medicine**, v. 34, n. 3, p. 511–522, 2006.
- OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414–420, 1 maio 2007.
- OZBAK, H. A. et al. Cinnamomum cassia exhibits antileishmanial activity against Leishmania donovani infection in vitro and in vivo. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, 1 maio 2019.
- OZOGUL, Y. et al. Recent developments in industrial applications of nanoemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 304, p. 102685, 1 jun. 2022.
- PANNEE, C.; CHANDHANE, I.; WACHAREE, L. Antiinflammatory effects of essential oil from the leaves of Cinnamomum cassia and cinnamaldehyde on lipopolysaccharide-stimulated J774A.1 cells. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 5, n. 4, p. 164, 1 out. 2014.
- 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, 1 dez. 2010.
- POKHARANA, M. et al. STABILITY TESTING GUIDELINES OF PHARMACEUTICAL PRODUCTS. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 8, n. 2, p. 169–175, 15 mar. 2018.
- RAI, V. K. et al. 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, 28 jan. 2018.
- RANI, R.; SHARMA, S. Recent advances in medicinal applications of essential oil. **Materials Today: Proceedings**, v. 68, p. 891–898, 1 jan. 2022.
- RASOOL, N. et al. Evaluation of essential oil extracted from ginger, cinnamon and lemon for therapeutic and biological activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 44, p. 102470, 1 set. 2022.
- RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 1 dez. 2014.
- SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: A pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 24–32, jan. 2010.
- SILVA, K. E. R. et al. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 129–135, 1 maio 2009.
- SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 28 abr. 2017.

- SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 246–254, 1 out. 2012.
- SOULAIMANI, B. et al. Optimization of antibacterial activity of essential oil mixture obtained from three medicinal plants: Evaluation of synergism with conventional antibiotics and nanoemulsion effectiveness. **South African Journal of Botany**, v. 151, p. 900–908, 1 dez. 2022.
- TAYEB, H. H.; SAINSBURY, F. Nanoemulsions in drug delivery: formulation to medical application. **Nanomedicine (London, England)**, v. 13, n. 19, p. 2507–2525, 1 out. 2018.
- TIAN, T. et al. Preparation of benzyl isothiocyanate nanoemulsions by different emulsifiers: Stability and bioavailability. **Process Biochemistry**, v. 111, p. 128–138, 1 dez. 2021.
- TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 7, p. R1231–R1249, 1 jul. 2014.
- TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of Essential Oils: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40–53, 1 jan. 2013.
- WANG, J. et al. Traditional uses, phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Cinnamomum* (Lauraceae): A review. **Fitoterapia**, v. 146, p. 104675, 1 out. 2020.
- YULIANI, S.; MUCHTADI, T. R.; SYAKIR, M. Changes in characteristics of nanoemulsion of cinnamon oil and their relationships with instability mechanisms during storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 10, p. e13745, 1 out. 2018.
- YUN, J. W. et al. In vitro and in vivo safety studies of cinnamon extract (*Cinnamomum cassia*) on general and genetic toxicology. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 95, p. 115–123, 1 jun. 2018.
- ZHANG, C. et al. *Cinnamomum cassia* Presl: A Review of Its Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology. **Molecules**, v. 24, n. 19, 25 set. 2019.