



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Biologia Molecular

**TESE DE DOUTORADO**

**Desenvolvimento de lipossomas vegetais com múltiplas funções biológicas  
aprisionados em hidrogéis**

**Tatiane de Melo Pereira**

Brasília-DF

2023



**Tatiane de Melo Pereira**

**Desenvolvimento de lipossomas vegetais com múltiplas funções biológicas  
aprisionados em hidrogéis**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

**Orientador:** Dr. Luciano Paulino da Silva

Brasília/DF

2023

Tatiane de Melo Pereira

**Desenvolvimento de lipossomas vegetais com múltiplas funções biológicas  
aprisionados em hidrogéis**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Luciano Paulino da Silva (Presidente – Orientador)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

---

Dr. Ricardo Bentes de Azevedo (Membro vinculado à Universidade de Brasília)  
Universidade de Brasília (UnB)

---

Dra. Rosa de Belem das Neves Alves (Membro externo)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

---

Dra. Kelliane Almeida de Medeiros (Membro externo)  
Hospital das Forças Armadas

---

Dra. Juliana Junqueira Pinelli (Membro suplente)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Brasília-DF, 29 de setembro de 2023.**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**REITORA**

Dra. Márcia Abrahão Moura

**VICE-REITOR**

Dr. Enrique Huelva Unternbäumen

**DECANO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Dr. Lucio Remuzat Rennó Júnior

**DECANA DE PESQUISA E INOVAÇÃO**

Dra. Maria Emília Machado Telles Walter

**DIRETOR DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Dr. Jaime Martins de Santana

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS (BIOLOGIA MOLECULAR)**

Dr. João Alexandre R. G. Barbosa

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por ter me sustentado e guiado até aqui. Ao meu marido (Bruno Pimentel Gomes), por estar realmente ao meu lado em todos os momentos, me apoiando e sustentando quando precisei. À minha mãe (Rossilda Silva Melo Pereira) que com tanta garra sempre me demonstrou que devo correr atrás dos meus sonhos e fazer acontecer. Ao meu irmão (Gustavo C. C. M. Pereira) do qual sempre me orgulhei e me fez crescer em um ambiente tão criativo e alegre. À toda a minha família paterna e materna que fizeram toda a diferença e demonstram tanto seu carinho mesmo estando de longe. À família do meu marido que me acolheu ao ponto de eu me sentir completamente à vontade e feliz como se fosse a própria família na qual eu cresci.

Agradeço às minhas amigas de Minas (Ana Luiza, Caroline, Maria Clara e Kênia), que sempre foram meu porto seguro, e mesmo estando longe de todas elas por tantos anos nossa relação só cresce, pois elas demonstram o amor e o cuidado por mim em todos os momentos da minha vida. Agradeço também aos meus amigos que criei aqui em Brasília, parecia tão distante quando cheguei aqui que pudesse chamar alguém assim, e hoje me orgulho de dizer que criei vários. Agradeço infinitamente aos meus amigos e companheiros de laboratório (Alice, Beatriz, Cíntia, Fernanda, Gabriela, Lucio, Luisa, Manuella, Thalita e Victória) que sem eles nada do que está escrito aqui seria feito, pelos dias comuns e alegres que cada um me proporciona.

Agradeço ao meu orientador Dr. Luciano Paulino da Silva, que sempre teve compreensão e foi realmente um orientador dedicado e engajado. Agradeço à Universidade de Brasília pelo ensino que me proporcionou. E também à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo espaço físico, que foi onde eu realizei meu trabalho pela infraestrutura e apoio oferecidos.

Agradeço ao Jardim Botânico de Brasília que colaborou com este trabalho e ofereceu toda a estrutura necessária para a coleta de materiais biológicos das espécies medicinais selecionadas. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“A perfeição da criação manifesta Teu  
esplendor, todo som, toda cor, toda tese  
seja louvor ao Rei da Glória”*

Adaptação da música: O dia que será  
para sempre – Rodolfo Abrantes

## Resumo

Lipossomas são vesículas concêntricas formadas por fosfolipídeos e são utilizados em vários setores da indústria, seja farmacêutica, alimentícia e até agrícola. Geralmente veiculam compostos isolados. O presente estudo foi conduzido visando extrair fosfolipídeos de materiais botânicos *in natura* e formular lipossomas para transporte de extratos da mesma origem botânica a fim de conferir atividades antimicrobianas, antioxidante e que não causem efeitos adversos em células eucarióticas para futura aplicação tópica. A partir de metodologia adaptada de tecnologia, com patente depositada previamente, foi possível extrair fosfolipídeos das folhas e caules de 20 espécies vegetais, e constatar que pelo menos 17 delas possibilitavam formular lipossomas sendo seus conteúdos água (Lipossoma vazio - LpV) ou extrato (Lipossoma cheio - LpC). Uma vantagem percebida no presente método é a não necessidade de extrusão por membrana ou outras técnicas de uniformização, tornando a produção de lipossomas mais acessível. Em LpV foram confirmados por espectroscopia Raman picos correspondentes à formação de lipossomas, também confirmada pela presença de fosfolipídeos nas nanoestruturas por termogravimetria. Essas nanoformulações foram testadas frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sendo que apenas 4 delas apresentaram atividade frente a *S. aureus*. E desses 4 lipossomas veiculando extratos etanólicos/aquosos (LpC.sec.et), apenas 2, os que carregavam extrato de alfazema e orégano na concentração de 250 mg/mL revelaram potencial antimicrobiano e antioxidante, preservando a viabilidade das células eucarióticas. Em ensaio com levedura *Saccharomyces cerevisiae*, os LpC.sec.et de alfazema e orégano demonstraram atividade fungistática no microrganismo, enquanto os extratos livres não demonstraram esse efeito, sendo que apenas LpC.sec.et de orégano demonstrou atividade fungicida. Dos LpC.sec.et, as taxas de encapsulamento encontradas foram de 56,33% e 91,70% para as espécies alfazema e orégano, respectivamente. Por microscopia de força atômica foi possível comprovar a presença de estruturas concêntricas compatíveis com a formação de lipossomas. Para conferir uma maior estabilidade e entrega sustentada dos lipossomas e seu conteúdo foi formulado um hidrogel com 3% de agarose e 2,5% de carboximetilcelulose. Esse hidrogel apresentou uma taxa de intumescimento adequada para aplicações terapêuticas, como aquelas esperadas para aplicações tópicas. A formulação de lipossomas incorporados em hidrogel ainda apresentou ação sobre *S. aureus*. Em teste de liberação em membrana de diálise, foi possível observar que o tempo necessário para o hidrogel liberar 90% do conteúdo lipossomal foi de 35 h, permanecendo a maior parte do tempo apresentando liberação sustentada a taxas relativamente constantes. Com base nos resultados obtidos foi possível a formulação de lipossomas 100% de origem vegetal com atividade antimicrobiana (bactéria Gram-positiva e levedura), atividade antioxidante e sem toxicidade para células eucarióticas.

**Palavras-chave:** nanoformulação, metabólitos secundários, bioatividades, viabilidade celular.

## Abstract

Liposomes are concentric vesicles formed by phospholipids, and find applications in various industries, including pharmaceuticals, food, and agriculture, often serving as carriers for isolated compounds. This study aimed to extract phospholipids from fresh botanical materials and formulate liposomes for transporting extracts of the same botanical origin to confer antimicrobial and antioxidant activities without adverse effects on eukaryotic cells for future topical applications. Using a previously patented adapted technology, phospholipids were successfully extracted from the leaves and stems of 20 plant species, with at least 17 of them allowing for liposome formulation, either containing water (Empty Liposome - LpV) or extract (Loaded Liposome - LpC). An advantage of this method is the absence of membrane extrusion or other uniformization techniques, making liposome production more accessible. Raman spectroscopy confirmed liposome formation in LpV, further substantiated by the presence of phospholipids in nanostructures via thermogravimetry. These nanoformulations were tested against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, with only four of them showing activity against *S. aureus*. Among these, liposomes carrying lavender and oregano extracts at a concentration of 250 mg/mL demonstrated antimicrobial and antioxidant potential, preserving eukaryotic cell viability. In yeast *Saccharomyces cerevisiae* assays, lavender and oregano LpC exhibited fungistatic activity, whereas free extracts did not, and only oregano LpC displayed fungicide activity. The encapsulation rates for lavender and oregano LpC were found to be 56.33% and 91.70%, respectively. Atomic force microscopy confirmed the presence of concentric structures consistent with liposome formation. To enhance liposome stability and sustained delivery, a hydrogel was formulated with 3% agarose and 2.5% carboxymethyl cellulose. This hydrogel exhibited suitable swelling behavior for therapeutic applications, particularly topical ones, and showed activity against *S. aureus*. Dialysis membrane release testing revealed that the hydrogel required 35 hours to release 90% of the liposomal content, maintaining sustained release at relatively constant rates for most of the time. Based on these results, it was possible to formulate liposomes of 100% plant origin with antimicrobial activity (against Gram-positive bacteria and yeast), antioxidant activity, and no toxicity to eukaryotic cells.

**Keywords:** nanoformulation, secondary metabolites, bioactivities, cell viability.

## Lista de Figuras

- Figura I.1** – Resumo gráfico do Capítulo I, indicando que o período da pandemia (março/2020 a março/ 2022) foi um intervalo integral para revisão de literatura e alteração de protocolos devido ao menor tempo de atuação em laboratório.....6
- Figura I.2** – Demonstração das fórmulas estruturais das principais classes de metabólitos secundários de plantas. Sendo A: compostos fenólicos A1) Flavonoides, A2) Taninos; B: Terpenos B1) Isopreno (unidade básica formadora de terpenos), B2) Saponinas; C: Alcaloides, C1) Estricnina, C2) Cafeína.....10
- Figura I.3** – Demonstração de lipossomas carreando ativos a) lipossomas unilamelares; b) lipossomas multilamelares.....11
- Figura I.4** – Representação esquemática de uma célula vegetal e suas principais organelas.....13
- Figura I.5** – Produtos naturais com atividades antibacterianas, com foco na potencialização de danos à membrana celular fazendo que o extrato adentre na célula através de uma proteína de canal.....14
- Figura I.6** – Representação tridimensional de uma matriz de hidrogel (em preto) intercalada com nanoestruturas amarelas de lipossomas, proporcionando um sistema de veiculação eficiente para extratos de plantas medicinais com propriedades bioativas, indicados por estruturas azuis, verdes e rosa.....22
- Figura I.7** – Fluxograma com a metodologia aplicada em todo o estudo. Formas com coloração verde indicam início de processos; com coloração amarela representando etapas de caracterização; com coloração azul indicando nanossistemas produzidos; e com coloração branca representando etapas intermediárias.....30
- Figura II.1** – Resumo gráfico do Capítulo I no qual foi desenvolvido um método fácil e barato para síntese de lipossomas utilizando plantas medicinais. Etapas iniciais para formulação de lipossomas a partir de fosfolipídeos extraídos diretamente de folhas e pecíolos (após extração de clorofila). A etapa nanoestruturação consistiu em adicionar o próprio extrato aquoso aos fosfolipídeos extraídos da mesma planta. A etapa de caracterização foi importante para confirmar o sucesso nas etapas anteriores.....48
- Figura II.2** – Fluxograma representativo das metodologias utilizadas para obtenção dos resultados apresentados no Capítulo II da presente Tese. Sendo o retângulo em verde a etapa inicial de coleta de material botânico; retângulos brancos, etapas intermediárias; e caixas em

coloração amarela, etapas de caracterização. Estrutura redonda azul demonstra quais nanomateriais foram produzidos, sendo LpC.in (lipossoma cheio contendo extrato aquoso obtido a partir de material botânico *in natura*), LpV (lipossoma vazio). As numerações em negrito abaixo de cada item do fluxograma indicam a numeração da seção na qual essa metodologia foi descrita no Capítulo I.....54

**Figura II.3** – Curvas cinéticas da concentração total de clorofila extraída e liberada durante o intervalo de tempo avaliado. Processos de extração da clorofila total das 20 espécies avaliadas utilizando cálculo realizado a partir de leituras espectrofotométricas nos comprimentos de onda de 633 e 645 nm.....56

**Figura II.4** – Imagens representativas da etapa de extração da clorofila presente nos materiais botânicos. a) Fotografias das folhas de três espécies diferentes, antes (esquerda) e após (direita) a etapa de extração da clorofila, sendo de cima para baixo as espécies capuchinha, alfazema e manjerição roxo; b) Clorofila extraída de diferentes espécies vegetais, sendo da esquerda para direita a extração das espécies: alfavaca, capuchinha, losna, orégano, tomilho, malva rosa e água como controle negativo. A barra preta representa 1 cm.....56

**Figura II.5** – Curva padrão da correlação entre a concentração de lectina de soja (mg/mL) e turbidez (NTU). A equação da reta e o  $r^2$  são apresentados.....57

**Figura II.6** – Quantificação dos lipídeos totais extraídos em miligramas por grama de material botânico *in natura*.....58

**Figura II.7** – Curvas de distribuição do tamanho (diâmetro hidrodinâmico) em número (%) de tentativas não bem sucedidas de formação de lipossomas com fosfolipídeos extraídos a partir de materiais biológicos de 3 diferentes espécies vegetais. Os lipossomas veiculam apenas água tipo I (linha azul) ou extrato aquoso das folhas da própria espécie utilizada para obter os fosfolipídeos (linha verde).....60

**Figura II.8** – Curvas de distribuição do tamanho (diâmetro hidrodinâmico) em número de lipossomas produzidos com fosfolipídeos extraídos a partir de materiais biológicos de 17 diferentes espécies vegetais, que apresentaram nanoestruturação em lipossomas vazios e contendo extrato. Os lipossomas podem veicular água tipo I (linha azul) ou extrato aquoso das folhas da própria espécie utilizada para obter os fosfolipídeos (linha verde), no lado esquerdo de cada gráfico, há uma imagem com dois tubos de tampa azul, sendo que o da esquerda contém lipossomas oriundos de filmes lipídicos ressuspensos em água e o da direita contém lipossomas que veiculam extrato.....62

<b>Figura II.9</b> – Imagens obtidas por microscopia de força atômica de lipossomas produzidos com moléculas extraídas de material vegetal da espécie <i>L. angustifolia</i> (alfazema). As imagens topográficas de altura apresentadas foram adquiridas no modo dinâmico (fase). a) Lipossomas ressuspensos em água em imagem 10 × 10 μm b) Lipossomas ressuspensos em extrato de <i>L. angustifolia</i> (alfazema) em imagem 10 × 10 μm.....	65
<b>Figura II.10</b> – Espectros Raman obtidos a partir da suspensão de lipossomas aplicados em placa de aço inoxidável, com lipossomas veiculando água (LpV; linha preta) e lipossomas veiculando extrato aquoso de <i>P. graveolens</i> (LpC.in; linha verde) e seus respectivos picos e bandas assinalados.....	67
<b>Figura III.1</b> – Resumo gráfico do Capítulo III, sendo que a partir de 11 materiais botânicos secos realizou-se uma triagem de quais apresentam atividade antibacteriana, capacidade antioxidante e que não tenham citotoxicidade sobre células eucarióticas.....	69
<b>Figura III.2</b> – Fluxograma da metodologia empregada no Capítulo III da presente Tese. O retângulo em verde representa a etapa inicial de coleta de material botânico; retângulos brancos representam etapas intermediárias; formas de coloração amarela representam etapas de caracterização. A estrutura redonda azul demonstra quais nanomateriais foram produzidos (LpV e LpC.sec.et). As numerações em negrito abaixo de cada item do fluxograma indicam a seção na qual essa metodologia foi descrita no Capítulo I.....	75
<b>Figura III.3</b> – Detalhes de microplacas de 96 poços contendo extratos etanólicos/aquosos e controles incubados com bactérias em meio LB líquido. a) Demonstração com amostras em triplicatas, da esquerda para a direita, de antibiótico, meio LB, meio LB com água e meio LB inoculado com bactéria Gram-positiva. Em b) <i>E. coli</i> e c) <i>S. aureus</i> , as amostras são dispostas na seguinte ordem da esquerda para direita e de cima para baixo: alfavaca, confrei, malva rosa, losna, alfazema, manjeriço, sálvia, açafreão, cavalinha, orégano e tomilho. A barra preta representa 1 cm.....	79
<b>Figura III.4</b> – Detalhes de uma microplaca de 24 poços contendo extratos etanólicos/aquosos e controles incubados com bactérias em meio LB sólido. Cada poço representa uma amostra, começando pela primeira linha da esquerda para direita: alfavaca, confrei, malva, losna, alfazema, manjeriço, sálvia, açafreão, cavalinha, orégano, tomilho e antibiótico. O painel a) referente à bactéria <i>E. coli</i> , e o painel b) referente à bactéria <i>S. aureus</i> . A barra preta representa 1 cm.....	80
<b>Figura III.5</b> – Curvas de distribuição do tamanho (diâmetro hidrodinâmico) em número de LpV e LpC.sec.et produzidos com fosfolípidos extraídos a partir de materiais biológicos <i>in</i>	

*natura* e extratos obtidos mediante material botânico seco de 11 diferentes espécies vegetais.....82

**Figura III.6** – Viabilidade celular (%) de J774A expostas aos extratos etanólicos/aquosos e os lipossomas correspondentes de diferentes espécies vegetais após 24 h de incubação. O método colorimétrico MTT foi utilizado para esta avaliação. A viabilidade celular é representada como PBS em 100% no controle negativo e DMSO como controle positivo. (a) Representa amostras estatisticamente diferentes de DMSO (controle positivo); (b) Representa que as amostras são estatisticamente diferentes do PBS (controle negativo); \* Indica que a amostra do lipossoma foi estatisticamente diferente do extrato que o mesmo veicula.....86

**Figura III.7** – Quantificação de fenólicos totais. O painel a) apresenta a curva de calibração obtida com leituras de absorvância no comprimento de onda de 630 nm (eixo y) em relação à massa de ácido gálico em µg (eixo x). Também demonstra a equação da reta obtida. O painel b) constitui a representação gráfica do equivalente de ácido gálico (mg) por 100 g de amostra (eixo y) e os extratos ou lipossomas contendo extratos (eixo x). As barras representam o desvio padrão da média das amostras. \* demonstra que as amostras de lipossomas e extratos da mesma espécie foram estatisticamente diferentes.....88

**Figura IV.1** – Resumo gráfico do Capítulo IV, com caracterização biológica frente a levedura, avaliação da forma e diâmetro seco, e eficiência de encapsulamento.....92

**Figura IV.2** – Fluxograma da metodologia empregada no Capítulo IV da presente Tese. Sendo o círculo em azul representa os lipossomas produzidos no Capítulo III e as formas de coloração amarela representam as etapas de caracterização. As numerações em negrito abaixo de cada item do fluxograma indicam a numeração da seção na qual essa metodologia foi descrita no Capítulo I.....98

**Figura IV.3** – Distribuição de tamanho (diâmetro hidrodinâmico), em número, de lipossomas produzidos a partir de fosfolipídios extraídos de várias plantas: (a) alfazema, (b) losna, (c) orégano e (d) sálvia. Os lipossomas são carregados com água tipo I (linha azul, lipossoma vazio) ou fito-extrato etanólico/aquoso da mesma planta como fonte de fosfolipídeos (linha verde, lipossoma completo).....99

**Figura IV.4** – Detalhes de uma microplaca de 24 poços contendo extratos etanólicos/aquosos, LpC.sec.et e controles incubados com a levedura *S. cerevisiae* em meio YEPD sólido. Sendo no painel (a) aplicação dos controles da esquerda para direita: Anfotericina B (controle positivo), meio com levedura (controle negativo), meio com água e apenas meio. E no painel (b) aplicação das amostras sendo sempre, da esquerda para direita, LpV, extrato livre,

LpC.sec.et coletado de 24 h e LpC.sec.et coletado de 48 h, e de cima para baixo as amostras: losna, alfazema, orégano e sálvia. A barra preta representa 1 cm.....	103
<b>Figura IV.5</b> – Curvas de calibração da correlação entre a concentração de cada extrato etanólico/aquoso (mg/mL) e a Cnd correspondente (em $\mu\text{s/cm}$ ) para (a) alfazema, (b) losna, (c) orégano e (d) sálvia. A linha vermelha demonstra a linearidade dos dados, juntamente com a equação indicada em cada gráfico e o $r^2$ correspondente.....	105
<b>Figura IV.6</b> – Imagens representativas de altura (topografia) obtidas por microscopia de força atômica em modo dinâmico dos LpV e LpC produzidos com fosfolipídeos extraídos de orégano. As imagens foram adquiridas com resolução de $512 \times 512$ linhas e taxa de varredura de 1 Hz. A) Imagens mostrando LpV com diferentes tamanhos e b) Imagens mostrando LpC.sec.et.....	107
<b>Figura IV.7</b> – <i>Box plot</i> das alturas em Z em nanômetros medidos no <i>software</i> SPM 9600 com auxílio do módulo de análise de partículas ( <i>particle analysis</i> ). Foram medidos cerca de 100 lipossomas para cada amostra com base nas imagens obtidas. LpV (lipossomas contendo água tipo I); LpC.sec.et (lipossomas contendo extrato etanólico/aquoso de orégano).....	108
<b>Figura IV.8</b> – Análises térmicas de lipossomas vazios (LpV) e lipossomas cheios contendo extrato etanólico/aquoso de orégano (LpC.sec.et) até $600^\circ\text{C}$ sob atmosfera de nitrogênio inerte. (a) Curvas de análise termogravimétrica, TGA e (b) Curvas de análise termogravimétricas derivada, DTG.....	110
<b>Figura IV.9</b> – Viabilidade (%) de células de sangue periférico bovino na presença de extratos etanólicos/aquosos e seus lipossomas após 72 h de incubação. O método colorimétrico MTT foi utilizado para esta avaliação. A viabilidade celular é representada como PBS em 100% e PMA como controle positivo. * Indica que a amostra foi estatisticamente diferente do PMA e # indica, também, que a amostra foi estatisticamente diferente do PBS ( $p < 0,05$ ).....	111
<b>Figura IV.10</b> – Curva de calibração comparando concentração de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) e absorvância no comprimento de onda de 548 nm. O gráfico também apresenta a equação da reta e o $r^2$ .....	112
<b>Figura IV.11</b> – Quantificação de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) em suspensões de células sanguíneas periféricas incubadas com as amostras de extratos livres, lipossomas vazios (LpV) e lipossomas cheios contendo os extratos de orégano (LpC.sec.et) por 72 h em três concentrações distintas. PBS e PMA foram utilizados como controles.....	114
<b>Figura V.1</b> – Resumo gráfico do Capítulo V, demonstrando um hidrogel vazio e um hidrogel contendo lipossomas e extratos vegetais. Ao redor são demonstradas etapas de caracterizações realizadas com os hidrogéis.....	116

<b>Figura V.2</b> – Fluxograma da metodologia empregada no Capítulo V da presente Tese. Sendo os retângulos brancos etapas intermediárias e as formas de coloração amarela etapas de caracterização. As numerações em negrito abaixo de cada item do fluxograma indicam a numeração da seção na qual essa metodologia foi descrita no Capítulo I.....	122
<b>Figura V.3</b> – Fragmentos de hidrogéis com porcentagem fixa de agarose (3%) e variações de carboximetilcelulose (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5%), sendo avaliados 3 fragmentos para cada concentração.....	123
<b>Figura V.4</b> – Curvas cinéticas da avaliação reológica de hidrogel de agarose (3%) e carboximetilcelulose (2,5%) por meio do teste de intumescimento em água e PBS, e teste de ressecamento, sendo cada teste realizado em triplicata.....	124
<b>Figura V.5</b> – Secção de hidrogel de agarose (3%) e carboximetilcelulose (2,5%) submetida ao teste de intumescimento em água (esquerda) quando comparada a secção de mesma área inicial submetida ao teste do ressecamento. Imagem obtida após 72 h de avaliação.....	124
<b>Figura V.6</b> – Exemplo representativos dos hidrogéis de agarose (3%) e carboximetilcelulose (2,5%) produzidos para o teste do halo de inibição, sendo o hidrogel da esquerda contendo os antibióticos penicilina e estreptomicina e o hidrogel da direita contendo LpC.sec.et de orégano.....	127
<b>Figura V.7</b> – Fotografia representativa de placa de Petri após 72 h da inoculação de <i>S. aureus</i> e exposição a hidrogéis. Hidrogel superior contendo antibiótico, inferior esquerdo contendo LpV e inferior direito apenas com água. Barra preta representa 1 cm.....	127
<b>Figura V.8</b> – Fotografias de placas de Petri em variados intervalos de tempo após inoculação. a) Inoculação com <i>E. coli</i> ; b) inoculação com <i>S. aureus</i> . Hidrogel superior contendo antibiótico, inferior esquerdo contendo extrato etanólico/aquoso de orégano e inferior direito contendo LpC.sec.et de orégano. Barra preta representa 1 cm.....	129
<b>Figura V.9</b> – Hidrogéis dentro de membranas de diálise de 12 a 14 kDa, sendo a da esquerda com hidrogel contendo LpV e a da direita contendo LpC.sec.et de orégano.....	130
<b>Figura V.10</b> – Perfil de difusão dos componentes através de membranas de diálise de 12-14 kDa de lipossoma vazio (LpV) ou de lipossoma contendo extrato etanólico/aquoso de orégano (LpC.sec.et). a) Demonstração do perfil de Cnd; b) Dados relativos normalizados para liberação de 100% dos lipossomas em 96 h.....	131

## Lista de Tabelas

<b>Tabela I.1</b> – Representação de plantas medicinais que têm suas atividades biológicas descritas, assim como seu perfil fitoquímico.....	16
<b>Tabela I.2</b> – Reações de identificação para triagem fitoquímica.....	33
<b>Tabela I.3</b> – Lipossomas produzidos durante todas as etapas do presente estudo.....	38
<b>Tabela II.1</b> – Avaliação da média aritmética e do desvio padrão obtidos a partir de três leituras realizadas no modo automático para o índice de polidispersividade (PdI) e três leituras no modo manual 20 aquisições para o potencial Zeta (pZ).....	63
<b>Tabela III.1</b> – Qualificação da presença ou ausência das classes de metabólitos secundários com base em cada reação.....	78
<b>Tabela III.2</b> – Avaliação da média aritmética e do desvio padrão da média obtidos a partir de três leituras realizadas em modo automático para o índice de polidispersividade (PdI) e três leituras em modo manual 20 aquisições para o potencial Zeta (pZ) dos LpC.sec.et.....	83
<b>Tabela III.3</b> – Demonstração da atividade antioxidante das amostras em relação ao percentual de neutralização (inibição) do DPPH para cada extrato etanólico/aquoso e seus respectivos LpC.sec.et. O ácido gálico atuou como controle positivo.....	90
<b>Tabela IV.1</b> – Índice de polidispersividade (PdI), potencial Zeta (pZ) e condutividade elétrica (Cnd-ME) obtidos para o extrato, lipossoma vazio (LpV) e lipossoma completo (LpC.sec.et). Os valores representam a média aritmética e o desvio padrão dos valores médios obtidos de três leituras independentes.....	101
<b>Tabela IV.2</b> – Análise da condutividade elétrica de extratos e extrato presente em lipossomas ultrafiltrados. Comparação entre a condutividade elétrica esperada se os extratos se encontrarem 100% fora dos lipossomas e a condutividade dos extratos remanescente nos ultrafiltrados de cada LpC-sec.et.....	106
<b>Tabela V.1</b> – Halo de inibição formado pelos hidrogéis contendo antibiótico (Anti), extrato de orégano (Ext) e LpC.sec.et de orégano (LpC) de nos tempos de 24, 48 e 72 h.....	128

## Lista de Abreviaturas e Siglas

Abs: Absorbância;	mm: Milímetro;
ANOVA: Análise de Variância;	MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5 Difeniltetrazólio;
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária;	mV: Milivolts;
ATCC: American Type Culture Collection;	mW: Miliwatt;
CCD: Dispositivo de carga acoplada;	ng: Nanograma;
cél: Célula;	nm: Nanômetro;
CEUA: Comissão de Ética no Uso Animal;	NTU: Unidade de Turbidez Nefelométrica;
cm: Centímetro;	OD: Densidade óptica;
Cnd: Condutividade elétrica;	P.A.: Para Análise;
DH: Diâmetro Hidrodinâmico;	Pa: Pascal;
DLS: Espalhamento de luz dinâmico;	PBS: Tampão fosfato salina;
DMEM: Meio Eagle Modificado por Dulbecco;	PdI: Índice de Polidispersividade;
DMSO: Dimetilsulfóxido;	pZ: Potencial Zeta;
DPPA: Difenil Fosforazidato;	RENISUS: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde;
DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil	RDC: Recibo de Depósito Cooperativo;
EE: Eficiência de encapsulamento;	ROS: Espécies reativas do oxigênio
ex: Exemplo;	rpm: Rotações Por Minuto;
g: Grama;	rpm: Rotações Por Minutos;
h: Hora;	s: Segundos;
Hg: Mercúrio	SFB: Soro Fetal Bovino;
Hz: Hertz;	SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade;
JBB: Jardim Botânico de Brasília;	SISGEN: Sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado;
kDa: Kilodalton;	U: Unidade;
kHz: Kilohertz;	YEPD: Extrato de Levedura Peptona Dextrose
L: Litro;	°C: Graus celsius;
LB: Luria Bertani;	µg: Micrograma;
LpC: Lipossoma cheio	µL: Microlitro;
LPS: Lipopolissacarídeo;	µm: Micrômetro;
LpV: Lipossoma vazio	
MFA: Microscopia de Força Atômica;	
mg: Miligrama;	
min: Minuto;	
mL: Mililitro;	

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	6
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Plantas medicinais .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2. Lipossomas.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3. Atividades de plantas medicinais .....</b>	<b>13</b>
1.3.1. <i>Atividade antibacteriana.....</i>	13
1.3.2. <i>Atividade antifúngica .....</i>	14
1.3.3. <i>Atividade antioxidante .....</i>	15
<b>1.4. Hidrogéis .....</b>	<b>21</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1. Objetivo geral.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>23</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Lista de reagentes.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2. Lista de materiais.....</b>	<b>26</b>
<b>3.3. Lista de equipamentos .....</b>	<b>28</b>
<b>3.4. Delineamento da metodologia.....</b>	<b>29</b>
<b>3.5. Coleta de materiais botânicos .....</b>	<b>31</b>
3.5.1. <i>Material botânico in natura .....</i>	31
3.5.2. <i>Material botânico seco.....</i>	31
<b>3.6. Preparação de extratos aquosos .....</b>	<b>31</b>
3.6.1. <i>Preparo de extratos aquosos dos materiais botânicos in natura.....</i>	31
3.6.2. <i>Preparo de extratos aquosos a partir de material botânico seco.....</i>	32
3.6.3. <i>Preparo de extratos etanólicos/aquosos a partir do material botânico seco .....</i>	32
<b>3.7. Triagem fitoquímica .....</b>	<b>33</b>
3.7.1. <i>Antraquinonas .....</i>	33
3.7.2. <i>Flavonoides .....</i>	34
3.7.3. <i>Saponina.....</i>	35
3.7.4. <i>Taninos.....</i>	35

<b>3.8. Quantificação da clorofila</b> .....	35
<b>3.9. Formulação de nanomateriais</b> .....	36
3.9.1. <i>Extração de fosfolipídeos</i> .....	36
3.9.2. <i>Quantificação dos fosfolipídeos extraídos</i> .....	37
3.9.3. <i>Formação de lipossomas</i> .....	37
<b>3.10. Caracterização dos lipossomas</b> .....	38
3.10.1. <i>Diâmetro hidrodinâmico (DH) e índice de polidispersividade (PdI) obtidos por espalhamento de luz dinâmico, potencial Zeta (pZ) e condutividade elétrica (Cnd-ME) obtidos por mobilidade eletroforética</i> .....	38
3.10.2. <i>Microscopia de força atômica (MFA)</i> .....	39
3.10.3. <i>Espectroscopia Raman</i> .....	39
3.10.4. <i>Determinação da eficiência de encapsulamento (EE) de extratos dos lipossomas</i> .....	39
3.10.5. <i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i> .....	40
<b>3.11. Ensaio de atividade antibacteriana</b> .....	40
<b>3.12. Teste de viabilidade em linhagens celulares de mamíferos</b> .....	41
3.12.1. <i>Teste de viabilidade com células isoladas</i> .....	41
3.12.2. <i>Teste de viabilidade celular com sangue periférico bovino</i> .....	42
<b>3.13. Quantificação de espécies reativas</b> .....	42
<b>3.14. Quantificação de compostos fenólicos totais</b> .....	43
<b>3.15. Ensaio de atividade antioxidante DPPH</b> .....	43
<b>3.16. Ensaio de atividade em levedura</b> .....	44
<b>3.17. Produção e triagem de hidrogel</b> .....	44
<b>3.18. Caracterização do hidrogel</b> .....	45
3.18.1. <i>Teste de intumescimento</i> .....	45
3.18.2. <i>Teste de ressecamento</i> .....	45
3.18.3. <i>Teste de fixação</i> .....	46
3.18.4. <i>Incorporação dos lipossomas em hidrogel</i> .....	46
3.18.5. <i>Formação de halo de inibição</i> .....	46
3.18.6. <i>Teste de liberação</i> .....	46
<b>3.19. Análises estatísticas</b> .....	47
<b>CAPÍTULO II</b> .....	48

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	51
2.	<b>OBJETIVOS</b> .....	53
3.	<b>METODOLOGIA</b> .....	54
4.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	55
4.1.	Quantificação da clorofila .....	55
4.2.	Quantificação de fosfolipídeos .....	57
4.3.	Análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta (pZ) .....	59
4.5.	Microscopia de força atômica (MFA) .....	64
4.6.	Espectroscopia Raman .....	65
4.7.	Ensaio de atividade antibacteriana .....	67
5.	<b>CONCLUSÕES PARCIAIS</b> .....	68
<b>CAPÍTULO III</b> .....		69
1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	72
2.	<b>OBJETIVOS</b> .....	74
3.	<b>METODOLOGIA</b> .....	75
4.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	76
4.1.	Triagem fitoquímica .....	76
4.2.	Ensaio de atividade antibacteriana dos extratos.....	78
4.3.	Análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta (pZ) .....	81
4.4.	Ensaio de atividade antibacteriana dos LpC.sec.et .....	84
4.5.	Teste de viabilidade em linhagem celular de mamífero .....	85
4.6.	Quantificação de compostos fenólicos totais .....	87
4.7.	Ensaio de atividade antioxidante DPPH.....	89
5.	<b>CONCLUSÕES PARCIAIS</b> .....	91
<b>CAPÍTULO IV</b> .....		92
<b>Resumo</b> .....		93
1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	95
2.	<b>OBJETIVOS</b> .....	97
3.	<b>METODOLOGIA</b> .....	98

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	99
<b>4.1. Análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta (pZ)</b> .....	99
<b>4.2. Ensaio de atividade em levedura</b> .....	102
<b>4.3. Eficiência de encapsulamento (EE)</b> .....	104
<b>4.4. Microscopia de Força Atômica (MFA)</b> .....	107
<b>4.5. Análise termogravimétrica</b> .....	109
<b>4.6. Teste de viabilidade celular com sangue periférico bovino</b> .....	110
<b>4.7. Quantificação de espécies reativas</b> .....	112
<b>5. CONCLUSÕES PARCIAIS</b> .....	115
<b>CAPÍTULO V</b> .....	116
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	119
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	121
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	122
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	123
<b>4.1. Produção e triagem do hidrogel</b> .....	123
<b>4.2. Teste de intumescimento PBS e água e teste de ressecamento</b> .....	124
<b>4.3. Teste de fixação</b> .....	125
<b>4.4. Teste de halo de inibição</b> .....	126
<b>4.5. Teste de liberação e determinação da constante k</b> .....	130
<b>5. CONCLUSÕES PARCIAIS</b> .....	133
<b>6. CONCLUSÕES / CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	134
<b>7. CRONOGRAMA FINAL</b> .....	135
<b>8. LISTA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA</b> .....	136
<b>8.1. Capítulos de livro</b> .....	136
<b>8.2. Artigos publicados em revistas internacionais</b> .....	136
<b>8.3. Artigos submetidos</b> .....	137
<b>8.4. Resumos publicados em Anais de eventos</b> .....	137
<b>8.4. Atuação como membro da comissão organizadora:</b> .....	138
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	139
<b>ANEXOS</b> .....	166

## Apresentação da Tese

A presente Tese intitulada “Desenvolvimento de lipossomas vegetais com múltiplas funções biológicas aprisionados em hidrogéis” está dividida em cinco capítulos.

O Capítulo I compreende a seção introdutória, que abrange referencial teórico e os objetivos da pesquisa, bem como detalha a metodologia empregada nos capítulos subsequentes. O referencial teórico contextualiza pesquisas em torno de plantas medicinais, nanomateriais e nanossistemas (com foco especial nos lipossomas), atividades biológicas e hidrogéis. Além disso, esse capítulo apresenta um fluxograma com delineamento experimental de toda tese.

O Capítulo II concentra-se em avaliar a possibilidade de extração de fosfolípidos e formular lipossomas 100% de origem vegetais, resultado ainda inédito na literatura.

O Capítulo III se dedica à obtenção de extratos com atividades antibacteriana e antioxidante e à formulação de lipossomas correspondentes.

O Capítulo IV se concentra na caracterização biológica e fisicoquímica dos lipossomas mais promissores desenvolvidos no Capítulo III.

Por fim, o Capítulo V enfoca em formular um hidrogel contendo lipossomas previamente caracterizados, com o objetivo de melhorar a estabilidade e liberação dos ativos dos lipossomas.

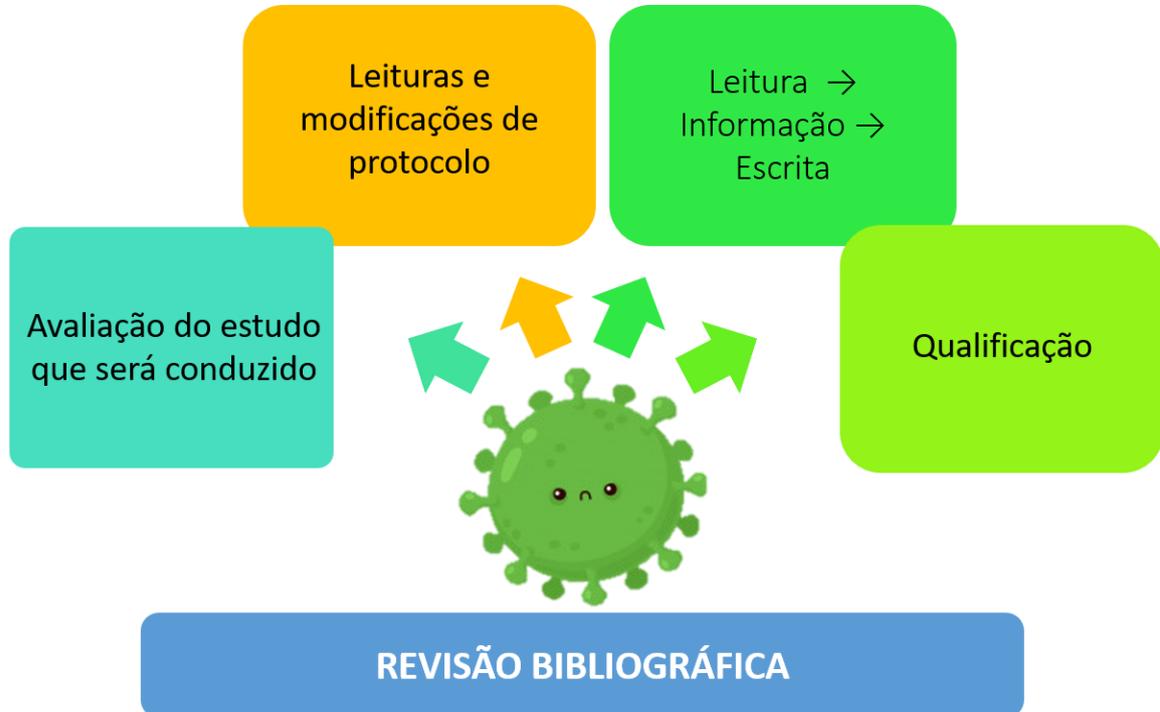
Cabe ressaltar que parte do conteúdo do Capítulos IV está incluída em um artigo publicado em setembro de 2023 no periódico *Biosensors*, conforme a seguinte referência:

“Pereira, T.M., Bonatto, C.C., Silva, L.P. *Rapid and Versatile Biosensing of Liposome Encapsulation Efficiency Using Electrical Conductivity Sensor. Biosensors. v. 13, n. 9, ID do artigo 878. 2023. <https://doi.org/10.3390/bios13090878>*”

Adicionalmente, outros dois manuscritos contendo os resultados da Tese apresentados nos Capítulos II e III, foram organizados e submetidos à revisão por pares de periódico internacional, encontrando-se em fase de avaliação.

## CAPÍTULO I

### UM TEMPO A MAIS PARA REFLEXÃO E REVISÃO



**Figura I.1** – Resumo gráfico do Capítulo I, indicando que o período da pandemia (março/2020 a março/2022) foi um intervalo integral para revisão de literatura e alteração de protocolos devido ao menor tempo de atuação em laboratório.

Fonte: da autora.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Plantas medicinais

Por milhares de anos, os seres humanos utilizam as plantas não apenas como fonte de alimentos e aromatizantes, mas também como medicinais (Marmitt, D., Shahrajabian, M.H. 2021; Shahrajabian, M.H., Sol, W., Cheng, Q. 2019). Comunidades locais já conhecem as utilizações medicinais de certas plantas há milhares de anos. Mesmo sem estudos científicos, o conhecimento tradicional, passado de geração em geração, já tratava enfermidades com o uso de plantas medicinais (Schippmann, U., Leaman, D.J., Cunningham, A. 2002; Lambert, J.; Srivastava, J.; Vietmeyer, N. 1997). Essas comunidades não sabem apenas quais plantas têm seus potenciais terapêuticos, mas sabem também qual parte da planta é melhor de se utilizar, sejam sementes, folhas, flores, frutos, caules ou raízes (Barragan-Zarate, G.S. et al., 2022). De modo geral, todas as partes das plantas são passíveis de serem utilizadas com alguma ação farmacológica (Shahrajabian, M.H., Sol, W., Cheng, Q. 2020).

O processo de extração é uma etapa crucial para o estudo e a potencial ação de produtos naturais oriundos de plantas (Azwanida, N.N. 2015). As plantas produzem tanto princípios ativos hidrofílicos quanto lipofílicos, sendo que para o primeiro grupo a obtenção é facilitada com extração em água e o segundo é possível obter com extração em solventes orgânicos. A seleção do solvente pode tanto facilitar quanto dificultar o processo de extração, influenciando conseqüentemente no seu rendimento final. Além disso, a temperatura é outro fator que também pode estar interligado à maior solubilidade dos compostos desejados, já que a energia cinética das moléculas aumenta com a temperatura, e conseqüentemente, aumenta a solubilidade do ativo (Abubakar, A.R., Haque, M. 2020). Então, a associação de técnicas farmacêuticas de alto desempenho aos conhecimentos tradicionais de plantas auxiliam na extração e entrega desses produtos naturais (Abubakar, A.R., Haque, M. 2020), e assim surgiu a farmacologia.

A farmacognosia, um ramo da farmacologia, é considerada uma abordagem para extrair, identificar compostos ativos e definir seus alvos terapêuticos, trazendo um novo conceito de tratamento para a sociedade (Hao, D.C., Xiao, P.G. 2014; Mao, Y. et al., 2017; Yu, G. et al., 2017). Atualmente, centenas de plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de doenças e cuja eficácia é cientificamente comprovada (Organização Mundial da Saúde, 2009). Essas plantas têm desempenhado um papel na medicina devido à coexistência de bioativos que podem ser empregados no tratamento dos mais diversos distúrbios, e já compreendem grande parte dos agentes farmacêuticos utilizados no tratamento de doenças (Pal, S.K., Shukla, Y. 2003). Então,

o termo planta medicinal refere-se a uma planta composta por ingredientes ativos que apresentam atividade biológica de interesse (Doughari, J.H. 2012). Uma planta inteira ou parte dela pode ter esses potenciais medicinais (Rungsung, W. et al., 2015; Sofowora, A. 1980).

Atualmente diversos países têm programas nacionais relacionados a fitoterápicos, como o Brasil que tem o Programa Nacional de Plantas medicinais e Fitoterápicos como a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) que incentiva a pesquisa com 71 plantas medicinais (Brasil, 2009). Uma grande parte das plantas medicinais selecionadas pelo RENISUS apresenta potenciais antibacterianos, antifúngicos e até mesmo anti-inflamatórios (Marmitt, D.J. et al., 2015).

Os ingredientes ativos das plantas, normalmente, advêm do metabolismo secundário, ou seja, não têm função direta em processos essenciais como a fotossíntese, respiração, transporte de solutos, assimilação de nutrientes ou síntese de proteínas, lipídeos e carboidratos (Mera, I.F., Falconí, D.E.G., Córdova, V.M. 2019). Os metabólitos secundários estão normalmente relacionados às funções adaptativas e de defesa das plantas (Bennett R.N., Wallsgrove, R.W. 1994). Esses metabólitos secundários são classificados a partir de vários critérios, sendo o principal deles segundo a via biossintética na qual o mesmo está envolvido. Sendo assim, os metabólitos secundários são normalmente subdivididos em três grandes classes: compostos fenólicos, terpenos e alcaloides (Mera, I.F., Falconí, D.E.G., Córdova, V.M. 2019).

Os compostos fenólicos perdem apenas para carboidratos em abundância nas plantas superiores (Amessis-Ocuchemoukh, N. et al., 2014) e são conhecidos pela sua notável atividade antiviral (Sol, W., Shahrajabian, M.H., Cheng, Q. 2021), antibacteriana, antifúngica (Karakas, F.P. et al., 2017) e anti-inflamatória (Sol, W., Shahrajabian, M.H., Lin, M. 2022). Algumas das subclasses mais conhecidas dos compostos fenólicos são: flavonoides, taninos e antraquinonas. Flavonoides são o maior grupo de compostos fenólicos, o nome deriva do latim “*flavus*” que significa amarelo, pois o primeiro conhecimento e uso dessa classe de metabólitos foi como pigmento natural. Taninos têm a capacidade de formar complexos com proteínas e podem influenciar o sabor, a adstringência e as propriedades antioxidantes dos alimentos. Antraquinonas são encontradas em plantas e também em fungos, e são conhecidas por suas propriedades de corante, bem como por suas atividades farmacológicas, como laxantes naturais (Mera, I.F., Falconí, D.E.G., Córdova, V.M. 2019).

Os terpenos ou isoterpenoides do ponto de vista químico são lipídeos. Muitas plantas apresentam terpenos em suas flores e frutos como mistura de compostos voláteis com odores

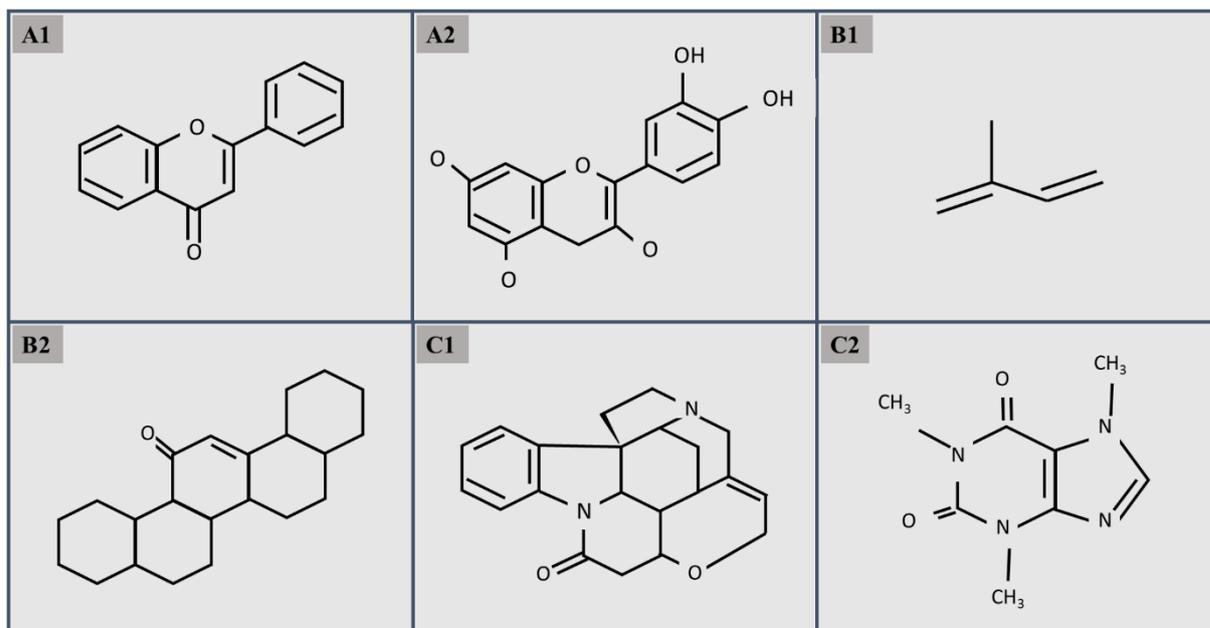
para atrair polinizadores ou dispersores (Trapp, S., Croteau, R. 2001). Suas subclassificações são dadas conforme o número de unidades de isoprenos que contêm, hemiprenos (1 unidade), monoterpenos (2 unidades), sesquiterpenos (3 unidades), diterpenos (4 unidades), triterpenos (6 unidades), tetraterpenos ou carotenoides (8 unidades) e politerpenos com > 9 unidades. Um exemplo bastante conhecido são as saponinas as quais são classificadas como glicosídeos de triterpenoides ou esteroides.

Por fim, os alcaloides são compostos que são produzidos não apenas por plantas, mas também em fungos e bactérias. A concentração de alcaloides pode variar muito, até mesmo em uma mesma planta (Azimova, S., Marat, Y. 2013). Os alcaloides apresentam notáveis propriedades fisiológicas e toxicológicas que exercem ação principalmente sobre o sistema nervoso central, se tornando verdadeiras drogas psicotrópicas e psicoativas, com dependência física/psíquica e aumento da tolerância ao seu uso (Kartsev, V.G. 2004). Suas subclassificações incluem alcaloides verdadeiros, protoalcaloides e pseudoalcaloides. As fórmulas estruturais dos principais metabólitos secundários de plantas estão apresentadas na Figura I.2.

Visto a vasta gama de metabólitos secundários e suas atividades conhecidas, a farmacologia já estabeleceu a composição e as atividades biológicas de vários produtos vegetais. A maioria dos constituintes biologicamente ativos dos extratos, como flavonoides, taninos e terpenoides, são altamente solúveis em água, mas apresentam baixa absorção na pele, pois são incapazes de atravessar as membranas lipídicas, e tem massas moleculares altas, resultando na perda de biodisponibilidade e eficácia desses ativos (Saraf, A.S. 2010; Mainardes, R.M. et al., 2006). Algumas plantas medicinais e seus extratos aquosos como a *Chamomilla* ssp podem ser utilizados como anti-inflamatórios tópicos para o tratamento de doenças de pele (Bhaskaran, N. et al., 2010). Porém, a utilização de plantas *in natura* ou de seus extratos muitas vezes tem efeitos minimizados devido à dificuldade de entrega do princípio ativo. De fato, muitos princípios ativos são insolúveis no meio de aplicação, as concentrações entregues são inferiores às concentrações biologicamente ativas, ou não ultrapassam a camada lipofílica da pele, necessitando de novas tecnologias para veiculação e transporte, como aquelas baseadas em nanossistemas, incluindo lipossomas (Hofland, H.E.J. et al., 1994).

O encapsulamento lipossomal de compostos naturais, além de melhorar a entrega e biodisponibilidade, ainda reduz o contato do fármaco e a reatividade com o meio ambiente e então os protege da fotodegradação e de outros tipos de degradação (Habib, M.J., Asker, A.F. 1991; Monfardini, C., Veronese, F.M. 1998). Por exemplo, a curcumina, conhecida por

degradar rapidamente em soluções tampão a 37°C, é totalmente protegida por encapsulamento em lipossomas na mesma temperatura (Chen et al., 2009; Wang et al., 1997). Lipossomas, com suas afinidades anfipáticas, podem ultrapassar a barreira promovida pelo estrato córneo (pele), e entregar o ativo nas camadas mais profundas da pele em concentrações tipicamente maiores do que o ativo livre e podem fazer a entrega sustentada de ativos (Cooley, M. et al., 2018).

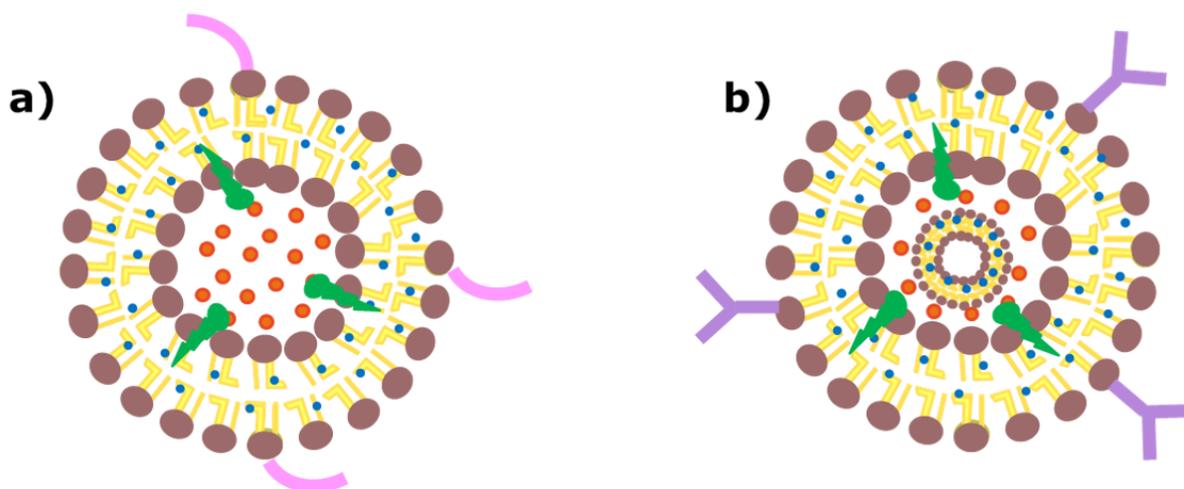


**Figura I.2** – Demonstração das fórmulas estruturais das principais classes de metabólitos secundários de plantas. Sendo A: compostos fenólicos A1) Flavonoides, A2) Taninos; B: Terpenos B1) Isopreno (unidade básica formadora de terpenos), B2) Saponinas; C: Alcaloides, C1) Estrictina, C2) Cafeína. Fonte: da autora.

## 1.2. Lipossomas

Lipossomas (ou lipossomos) são vesículas compostas basicamente por fosfolipídeos, com diâmetros variando tipicamente de 20 a 1000 nm (Kim, K.Y. 2007). Os lipossomas podem ter alguns tipos de organizações estruturais, sendo que as principais são: com uma bicamada lipídica, denominadas vesículas unilamelares; e aquelas com duas ou mais bicamadas lipídicas, denominadas vesículas multilamelares, conforme ilustrado na Figura I.3. O primeiro tipo favorece a veiculação de princípios ativos hidrofílicos e o segundo tipo a veiculação de ativos lipofílicos (Papahadjopoulos, D., Watkins, J.C. 1967; Contri, R.V. et al., 2014). A característica de possibilitar o transporte de moléculas com uma diversidade de polaridades e fazer com que o ativo seja veiculado até locais em que a molécula livre não conseguiria atingir devido à incompatibilidade de solubilidade e também o fato de possibilitar a entrega sustentada do

princípio ativo são algumas das principais vantagens da utilização deste tipo de nanossistema (Lai, R.C. et al., 2018).



**Figura I.3** – Demonstração de lipossomas carreando ativos a) lipossomas unilamelares; b) lipossomas multilamelares.

Fonte: da autora.

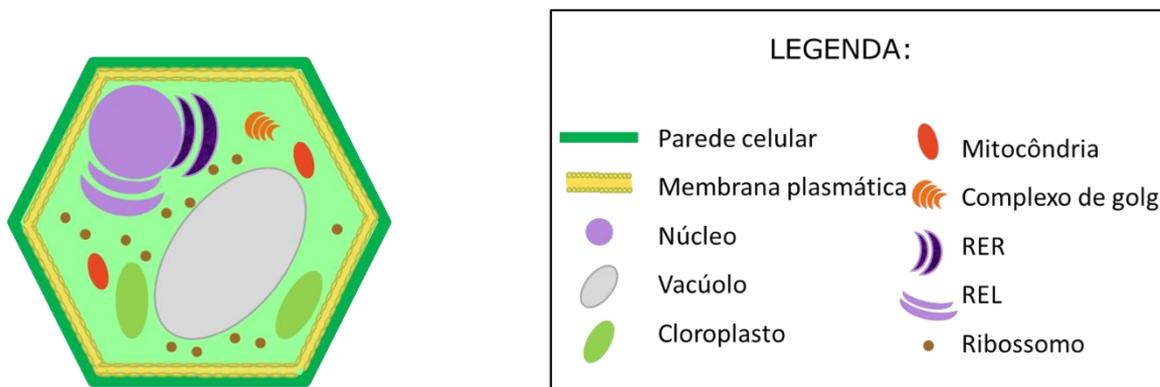
Quanto à origem, os fosfolípidos comumente empregados na formulação de lipossomas são classificados em dois grupos, sintéticos e naturais (Batista, C.M. et al., 2007). Para a obtenção de fosfolípidos sintéticos, como o difenil fosforazidato (DPPA), é necessário realizar uma série de etapas até algumas necessitando da utilização de benzeno e outros solventes potencialmente tóxicos (Ninomiya, K.T., Shioiri, T., Yamada, S. 1974). Mesmo que alguns desses reagentes tenham sido substituídos recentemente por solventes sustentáveis, o próprio DPPA é tóxico, com potenciais mutagênicos e carcinogênicos (Wolff, O., Waldvogel, S.R. 2003). Já outros fosfolípidos como a fosfatidilcolina são mais seguros e mais utilizados, e podem ser obtidos pela via sintética ou natural. De todo modo, em geral, a via sintética é mais onerosa do que a obtenção a partir de fontes naturais (Lai, R.C. et al., 2018).

Os fosfolípidos naturais utilizados para formulação de lipossomas podem ser obtidos a partir de uma vasta gama de recursos biológicos, incluindo gema de ovo (Vilamarim, R. Et al., 2018); macrófagos (Nguyen, V.L., 2018); eritrócitos (Silva, L.P., Bonatto, C.C., Joanitti, G.A., 2016); membranas bacterianas (Tu, Y., 2003); ovas de salmão (Tanaka, Y., Sakaki, I., Ohkubo, T., 2004); miudos de peixes (Zhang, J., et al 2018); entre outros. Entretanto, muitas das fontes utilizadas para essa extração natural dos fosfolípidos e síntese de lipossomas são em sua maioria provenientes de fontes animais ou microrganismos e para realizar a extração necessita-se em muitos casos de autorizações por comitês de ética (quando de animais vivos,

diretamente da natureza, e não de matadouros), e mesmo com a retirada direta de órgãos de animais obtidos em matadouros ou utilização de microrganismos, esses materiais biológicos são potenciais portadores de contaminantes e patógenos (ex: vírus) que envolvem risco à saúde humana.

Uma das possibilidades ainda pouco explorada para formulações à base de lipossomas seria com o emprego de fosfolipídeos extraídos por solventes de diversas fontes vegetais *in natura*. Já é reconhecida a extração de fosfolipídeos de óleos de grãos de soja (Montanari, L. et al., 1997) e canola (Dunford, N.T., Temelli, F. 1995), entretanto deve-se proceder primeiramente com a extração do óleo e posteriormente a extração dos fosfolipídeos. Porém, há ausência de relatos na literatura de procedimento extração por método fácil para formulações de lipossomas a partir de 100% de material vegetal, ou seja, incluindo além dos fosfolipídeos neste caso também o princípio ativo veiculado diretamente do material botânico. Assim, a utilização de materiais botânicos, além de facilitar em muitos casos a obtenção de fosfolipídeos devido à sua disponibilidade alta, pode oferecer materiais que não envolvam risco de eventual presença de agentes infecciosos a humanos, sem contar os benefícios adicionais que podem ser alcançados se o encapsulamento for realizado com extratos vegetais de plantas medicinais reconhecidas quanto a alguma atividade de interesse. De modo similar às células animais, a composição da membrana plasmática de células vegetais também é constituída, em sua quase totalidade, por fosfolipídeos, mas esses ainda não são rotineiramente extraídos e utilizados para a síntese de lipossomas.

Célula vegetais, conforme demonstrada na Figura I.4, apresentam paredes celulares rígidas e no seu interior, organelas com pigmentos, dentre eles a clorofila. Estas estruturas constituem alguns dos desafios que fazem com que células vegetais não sejam comumente utilizadas para obtenção de matérias-primas para produção de lipossomas. Porém, novas abordagens para a extração de fosfolipídeos de materiais de origem vegetal podem tornar células vegetais entre algumas das fontes mais viáveis para a extração de fosfolipídeos em larga escala e com atributos desejáveis visto que podem oferecer não apenas constituintes de parede dos lipossomas (fosfolipídeos), mas também princípios ativos a serem veiculados.



**Figura I.4** – Representação esquemática de uma célula vegetal e suas principais organelas. Fonte: da autora.

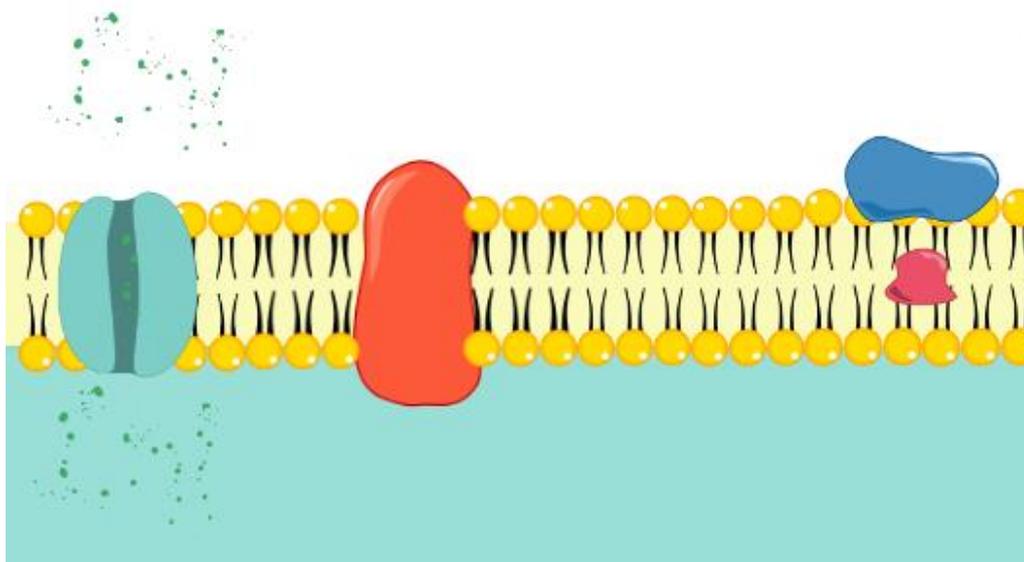
### 1.3. Atividades de plantas medicinais

As plantas têm sido utilizadas, há milhares de anos como uma fonte de medicamentos (Vashist, H., Jindal, A. 2012) e muitas delas já foram cientificamente comprovadas quanto às suas atividades biológicas. A Tabela I.1 apresenta alguns exemplos de espécies, partes utilizadas, classes de metabólitos secundários, principais compostos já isolados e suas atividades biológicas. Essas plantas são fonte de compostos químicos com potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos para uma variedade de doenças.

#### 1.3.1. Atividade antibacteriana

Hoje a resistência de microrganismos é uma séria preocupação mundial (Prestinaci, F., Pezzotti, P., Pantosti, A. 2015). Apenas nos Estados Unidos, aproximadamente 23000 pessoas morrem por ano acometidas por infecções por bactérias resistentes a antibióticos (Enani, M.A. 2015). As plantas e seus ativos podem ser considerados como uma alternativa aos medicamentos químicos, visto que em geral têm menos efeitos adversos. Estima-se que 60% dos compostos anticâncer e 75% dos fármacos utilizados contra infecções advêm de compostos naturais (McChesney, J.D., Venkataraman, S.K., Henri, J.T. 2007). Existem vários mecanismos já descritos para o modo de ação de metabólitos secundários advindos de plantas, alguns deles fazem a integralização dos metabólitos secundários mediante proteínas de canal, como demonstrado na Figura I.5, e ocasionam dano sobre a membrana celular bacteriana (Nourbakhsh, F., et al., 2020). Já foi descrito na literatura que carvacrol extraído de *Origanum majorana*, após adentrar a célula atua na bicamada lipídica de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*

e outros microrganismos (Baranauskaitė, J. et al., 2016). Também há relato que o composto timol de *Thymus vulgaris* causa dano a *Staphylococcus aureus* fazendo a destruição/remoção dos fosfolipídeos (Chauhan A.K., Kang, S.C. 2014). Ou seja, os agentes antibacterianos, com efeito, inibidor de crescimento (bacteriostático) ou, com efeito, biocida (bactericida) devem passar pelas vias de membrana para causar algum efeito prejudicial às bactérias.



**Figura I.5** – Produtos naturais com atividades antibacterianas, com foco na potencialização de danos à membrana celular fazendo que o extrato adentre na célula através de uma proteína de canal. Fonte: da autora.

### 1.3.2. Atividade antifúngica

As infecções fúngicas também são complicações potencialmente fatais (Ascioglu, S. et al., 2002). Como fator agravador, muitos medicamentos disponíveis têm efeitos colaterais indesejáveis (Weitzman, I., Summerbell, R.C. 1995; White, T.C., Marr, K.A., Bowden, R.A., 1998). Portanto, a descoberta de extratos de plantas que apresentem, além da atividade antibacteriana, atividade antifúngica é essencial, principalmente quando se trata de aplicações tópicas, já que durante infecções/inflamações de pele fungos oportunistas podem proliferar. Já foi demonstrado que a baicaleína e wogonina, extraídas de raízes de *Scutellaria baicalensis*, exibiram atividade antifúngica pronunciadas. Naquele estudo, a baicaleína afetou a integridade de membrana celular e causou o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos fungos e o tratamento com wogonina promoveu a diminuição no potencial de membrana mitocondrial de *Trichophyton mentagrophytes* (Da, X. et al., 2019). Existem pelo menos 6 mecanismos de ação citados na literatura para o efeito antifúngico de metabólitos secundários de plantas. Os

terpenos são citados por atuar pela ruptura de membrana e também destruição de mitocôndrias fúngicas (Walker, G., White, N. 2012; Tian, J. et al., 2012). Os compostos fenólicos estão interligados com a mesma atividade dos terpenos, além da ação na parede celular (Tian, J. et al., 2012; Wu, X.Z. et al., 2008). Por fim, os alcaloides estão correlacionados com a atuação em parede celular e ruptura de membrana plasmática (Bagiu, R.V., Vlaicu, B., Butnariu, M. 2012). Ou seja, quando se trata de atividade antifúngica de plantas medicinais há inúmeros mecanismos de ação.

### *1.3.3. Atividade antioxidante*

Os antioxidantes são importantes substâncias inibitórias contra a deterioração oxidativa por espécies reativas de células e os mesmos têm um papel importante na prevenção de uma série de doenças. As espécies reativas são moléculas ou íons que apresentam alta reatividade química devido a presença de elétrons desemparelhados em suas estruturas eletrônicas. As espécies reativas acabam participando de reações químicas a fim de estabilizar-se por meio da doação ou recepção de elétrons (Juan, C.A. et al., 2021). Exemplos de moléculas reativas são: i) radicais livres, que são moléculas que contêm um elétron não emparelhado em sua camada externa, ii) espécies reativas de oxigênio (ROS) que são conhecidas por causarem estresse oxidativo e danos celulares, iii) espécies reativas de nitrogênio, que desempenham papéis importantes na sinalização celular e na resposta imunológica, mas também podem causar danos quando produzidos em excesso (Kohno, M. 2010).

Quando os antioxidantes são relacionados ao uso tópico, diversos aspectos podem ser inferidos quanto à sua atuação na prevenção do envelhecimento cutâneo (Ahmed, A.F. et al., 2019). Muitas plantas inteiras e partes delas já foram relatadas como fontes abundantes de antioxidantes (Shahidi, F. 1997). Há décadas estudos demonstram que quando plantas são expostas à luz solar forte produzem uma maior quantidade de ROS (Asada, K., e Takahashi, M. 1987), no entanto, algumas plantas mesmo expostas a condições severas crescem normalmente, indicando que elas têm um sistema de proteção endógeno contra essas espécies nocivas (Masuda, T. et al., 1999). De fato, os metabólitos secundários presentes em plantas podem prevenir danos causados por radicais livre pela eliminação de ROS, promover a ativação de enzimas antioxidantes, realizar a inibição de oxidases e estimular a redução de radicais  $\alpha$ -tocoferol (Shen, N. et al., 2022).

**Tabela I.1** – Representação de plantas medicinais que têm suas atividades biológicas descritas, assim como seu perfil fitoquímico.

Nome científico	Nome popular	Parte utilizada	Solvente utilizado para extração	Principais compostos encontrados	Principais metabólitos	Principais atividades biológicas	Referências
<i>Aloe arborescens</i>	Babosa	Folhas	Etanol 80%	Aloína, aloe-barbendol, Aleosina, feroxidina, Ginesteína, ácido caféico, ácido clorogênico e ácido ferúlico	Flavonoides e flavonois	Antioxidante, antimicrobiana, cicatrizante, antitumoral, anti-inflamatória	Lucini, L. et al., 2015.
<i>Artemisia absinthium</i>	Losna	Partes aéreas	Metanol	Ácido clorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido 4-cafeoilquínico, 2',6'-di-hidroxi-4-metoxicalcona-4'-O-neohesperidosídeo	Flavonoides	Antibacteriana e cicatrizante	Boudjelal, A. et al., 2020
<i>Artemisia alba</i>	Cânfora	Inflorescências	Metanol	Ácido clorogênico, quercetina, ácido benzóico, ácido transcinâmico, ácido seríngico, ácido p-cumárico	Flavonoides e cumarinas	Anticancerígena, antimalária, antimicrobiana, anti-inflamatória	Jakovljević, M.R. et al., 2020
<i>Curcuma longa</i>	Açafrão	Rizoma	Etanol e álcool isopropílico	Ar-tumerona, (Z)- $\gamma$ -atlantona e (E)- $\gamma$ -atlantona	Flavonoides e quinonas	Antioxidante, anticancerígena.	Braga, M.E.M. et al., 2003;
		Folhas	Água	Curcumina, Curcuminóides (desmetoxi-curcumina e bis-demetoxi-curcumina), $\alpha$ -felandreno, 2-careno, eucaliptol, o-cimeno	Taninos, alcaloides, fenóis, esteróides, flavonoides, terpenoides, saponinas	Antimicrobiana, antimutagênica, anticancerígena, anti-leishmania, antioxidante	Albaquami, J.J. et al., 2022.

(continua)

**Tabela I.1** – Representação de plantas medicinais que têm suas atividades biológicas descritas, assim como seu perfil fitoquímico.

(continuação)

Nome científico	Nome popular	Parte utilizada	Solvente utilizado para extração	Principais compostos encontrados	Principais metabólitos	Principais atividades biológicas	Referências
<i>Equisetum arvense</i>	Cavalinha	Folhas e caules	Metanol	Quercetina, Campferol, Campferol-3-O-glicosídeo, Luteolina	Flavonoides, saponinas, taninos e alcaloides	Anti-inflamatória, antimicrobiana, anticancerígena e anticonvulsivante	Ismail, A.M. et al., 2020
<i>Euphorbia tirucalli</i>	Avelós 2	Calos obtidos da raiz	Água	-	-	Atividade moluscicida	Juberg, P., Cabral Neto, J.B., Schall, V.T. 1985;
		Folhas e caules	Metanol	Hentriacontano, 4-deoxi-forbol, beta-sitosterol, ácidos elágicos, ácido gálico e glicosídeos	Alcaloides, cumarinas, polifenóis, taninos e triterpenos	Antimicrobiana, antiviral	Upadhyay, B., Singh, K.P., Kumar, A. 2010
<i>Euphorbia tulearensis</i>	Avelós 1	Látex	Água	-	Diterpenoides	Anti-infecciosa	Van, W.B.E. Van, H.F., Van, O.B. 2002
<i>Lavandula angustifolia</i>	Alfazema	Inflorescências	Etanol 50%	Ácido rosmarínico, ácido ferúlico, ácido cafeico, herniarina	Flavonoides e cumarinas	Antioxidante	Dobros, N., Zawada, K., Paradowska, K. 2022
<i>Mimosa pudica</i>	Dormideira	Folhas	Etanol	-	Alcaloides, glicosídeos, flavonoides	Antimicrobiana	Tamilarasi, T., Ananthi, T., 2012.

(continua)

**Tabela I.1** – Representação de plantas medicinais que têm suas atividades biológicas descritas, assim como seu perfil fitoquímico.

(continuação)

Nome científico	Nome popular	Parte utilizada	Solvente utilizado para extração	Principais compostos encontrados	Principais metabólitos	Principais atividades biológicas	Referências
<i>Ocimum gratissimum</i>	Alfavaca	Folha	Etanol 70%	Ácido sinápico, ácido rosmarínico, eugenol, luteolina, apigenina, nepetoidina A, xantomicrool, nevadensina, himenoxina, salvigenina, apigenina	Polifenóis, flavonoides, ácidos graxos	Antioxidante, anti-inflamatória e proteção contra danos ao DNA	Venuprasad, M.P. et al., 2014.
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	Partes aéreas	Água, metanol, etanol, hexano e acetato de etila	Ácido cafeico, ácido gálico, ácido rosmarínico, apigenina, quercetina, naringenina, caempferol	Flavonoides	Antioxidante e anticancerígena	Koldas, S. et al., 2016
<i>Pelargonium graveolens</i>	Malva rosa	Folhas	Hexano, acetato de etila e metanol	Citronelol, geraniol, 6-Octen-1-ol, 3,7-dimetil-formato, selineno, linalol, L-mentona.	Flavonoides, cumarinas, curcuminoides e terpenos	Antimicrobiana	Hsouna, A.B., Hamdi, N. 2012
<i>Perilla frutescens</i>	Manjericã o roxo	Folhas	Metanol	Ácido cafeico, ácido rosmarínico, cianidina-3- O- (6- O -cumaroil) glicosídeo-5-O-glicosídeo	Antocianinas e flavonas	Antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, efeitos cardioprotetores e vasodilatadores	Kang, N.S., Lee, J.H. 2011

(continua)

**Tabela I.1** – Representação de plantas medicinais que têm suas atividades biológicas descritas, assim como seu perfil fitoquímico.

(continuação)

Nome científico	Nome popular	Parte utilizada	Solvente utilizado para extração	Principais compostos encontrados	Principais metabólitos	Principais atividades biológicas	Referências
<i>Plantago major</i>	Tansagem	Partes aéreas	Etanol 70%	Quercetina	Polissacarídeos, alcaloides, flavonoides, terpenoides, taninos, saponinas e esteróis	Antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e cicatrizante	Ghiasian, M. et al., 2021
<i>Salvia officinalis</i>	Sálvia	Partes aéreas	Água	Ácido cafeico, ácido yunnaneico, ácido rosmarínico, ácido salvianólico, ácido sagerínico	Flavonoides	Antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana	Afonso, A.F. et al., 2019
<i>Symphytum officinale</i>	Confrei	Calos obtidos da raiz	Etanol 70%	Ácido m-metoxibenzóico, ácido 5-cafeoilquínico, ácido caféico, ácido 3-cafeoilquínico, ácido rosmarínico, ácido 1-cafeoilquínico, cumarina, ácido litospérmico, ácido salicílico e ácido 1m-hidroxibenzóico	Taninos, saponinas e fitosteróis	Anti-inflamatória, antioxidante e neuroprotetoras	Le, V. et al., 2021
<i>Taraxacum officinale</i>	Dente-de-leão	Raiz	Metanol 80%	Ácidos hidroxicinâmicos, ésteres de inositol de ácido hidroxifenilacético e derivados de lactona sesquiterpênica	Flavonoides, triterpenos e cumarinas	Antioxidante e anticoagulante	Jedrejek, D. et al., 2019

(continua)

**Tabela I.1** – Representação de plantas medicinais que têm suas atividades biológicas descritas, assim como seu perfil fitoquímico.

(conclusão)

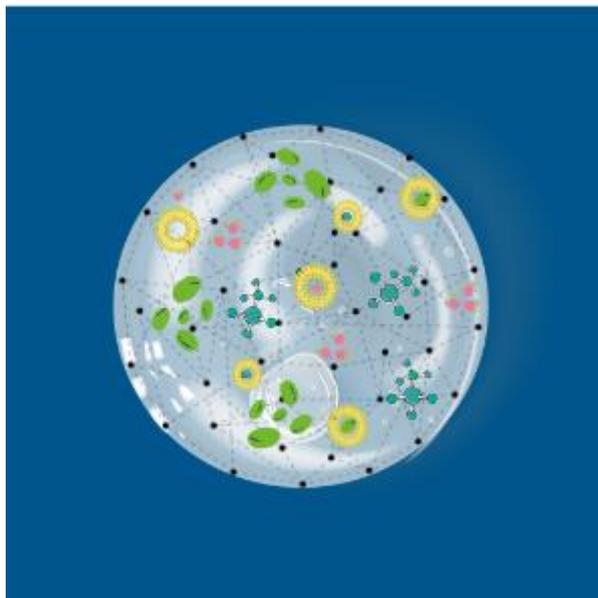
Nome científico	Nome popular	Parte utilizada	Solvente utilizado para extração	Principais compostos encontrados	Principais metabólitos	Principais atividades biológicas	Referências
<i>Tetradenia riparia</i>	Mirra	Folhas	Etanol	-	Taninos, fenois, glicosídeos, esteroides, terpenoides	Antifúngica	Kakande, T. et al., 2019
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho	Partes aéreas	Acetato de etila	Timol, p-cimeno, eugenol, terpineno, quercetina e caempferol	Flavonoides, saponinas, alcaloides, terpenoides, taninos, glicosídeos, esteroides e fenóis	Antioxidante e antibacterianas e anti-inflamatória	Saleem, A. et al., 2022
<i>Tropaeolum majus</i>	Capuchinha	Flores e folhas	Acetona	Violaxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina, zeinoxantina, $\beta$ -criptoxantina, $\alpha$ caroteno e beta-caroteno	Flavonoides, glucosinolatos, terpenoides	Anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante	Niizu, P.Y., Rodriguez-Amaya, D.B. 2005

#### 1.4. Hidrogéis

Hidrogel é uma rede tridimensional à base de polímeros, que podem sofrer reticulação (*crosslinking*) e reter abundantemente água ou outros solventes polares; e consegue aprisionar dentro de si compostos bioativos. As propriedades mecânicas e capacidade de difundir são determinadas por sua estrutura e grau de ligações existentes na matriz do hidrogel (Singh. T.R.R., Laverty, G., Donnelly, R. 2018). A maioria dos polímeros utilizados para produção de hidrogéis são biocompatíveis e biodegradáveis (Contri. R.V. et al., 2014). Há uma vasta gama de aplicações de hidrogéis, desde engenharia automotiva até a medicina regenerativa, e também para a entrega de princípios ativos utilizados na medicina.

A utilização de hidrogéis em formulações para aplicações tópicas é justificada pela sua adesividade, facilidade de manter o local hidratado e compor uma rede para que as células possam migrar e se regenerar. Porém, o potencial de hidrogéis para controlar a entrega de fármacos também deve ser um dos fatores importantes quando se trata da incorporação de bioativos, incluindo nanossistemas como lipossomas. Como uma das principais desvantagens do uso de lipossomas é a baixa estabilidade em sistemas biológicos (Sapra, P., Allen, T.M. 2003), uma possibilidade promissora seria a de incorporar esses nanossistemas em matriz de hidrogel. Nesse sentido, o aprisionamento de lipossomas em hidrogel pode aumentar a estabilidade física e química do mesmo, propiciando maior interação entre lipossomas e o sistema biológico. Consequentemente, também há maior possibilidade de ocorrer a entrega sustentada do princípio ativo.

A obtenção de hidrogéis contendo lipossomas produzidos com diferentes fosfolipídeos veiculando extratos de plantas medicinais, conforme a Figura I.6, para uso tópico direcionado pode permitir a oferta e estabilização desses ativos. Além disso, pode ainda permitir que populações de baixa renda tenham acesso a um produto que alie alta tecnologia com ação potencializada e sustentabilidade. A incorporação de lipossomas em hidrogéis para uso tópico também pode facilitar a entrega e aplicação do princípio ativo, pois pode conferir propriedades altamente desejáveis como a adesividade.



**Figura I.6** – Representação tridimensional de uma matriz de hidrogel (em preto) intercalada com nanoestruturas amarelas de lipossomas, proporcionando um sistema de veiculação eficiente para extratos de plantas medicinais com propriedades bioativas, indicados por estruturas azuis, verdes e rosa. Fonte: da autora.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Desenvolver lipossomas a partir de recursos vegetais, com propriedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes e que não comprometam na viabilidade em células eucarióticas, para incorporação em hidrogéis visando aplicações terapêuticas.

### 2.2. Objetivos específicos

- Prospectar 20 plantas medicinais com atividades biológicas reconhecidas na literatura (Capítulo I);
- Realizar triagem fitoquímica de extratos a fim de definir à possível presença de classes de metabólitos secundários (Capítulo III);
- Desenvolver rota para extração, isolamento e quantificação de fosfolipídeos vegetais (Capítulo II);
- Produzir formulações lipossomais à base de fosfolipídeos e extratos vegetais (Capítulo II, III e IV);
- Caracterizar os lipossomas por técnicas de espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletroforética (Capítulo II, III e IV);
- Caracterizar os lipossomas por microscopia de força atômica (Capítulo II e IV);
- Caracterizar os lipossomas por espectroscopia Raman (Capítulo II);
- Testar os lipossomas quanto à possível atividade antibacteriana (Capítulo II e III);
- Verificar a viabilidade celular de linhagem isolada de mamífero frente à lipossomas e extratos (Capítulo III);
- Testar os lipossomas quanto à possível atividade sobre levedura (Capítulo IV);
- Testar os lipossomas quanto à possível capacidade antioxidante (Capítulo III);
- Quantificar fenólicos totais em lipossomas e extratos livres (Capítulo IV);
- Determinar a eficiência de encapsulamento de extratos nos lipossomas produzidos (Capítulo IV);
- Caracterizar os lipossomas por termogravimetria (Capítulo IV);
- Verificar a viabilidade celular de sangue periférico bovino frente à lipossomas e extratos (Capítulo IV);
- Verificar a produção de espécies reativas em células de mamíferos frente à lipossomas e extratos (Capítulo IV);

- Selecionar a melhor concentração de polímeros para produção de hidrogéis (Capítulo V);
- Avaliar as características reológicas dos hidrogéis produzidos por testes de intumescimento, ressecamento e fixação (Capítulo V);
- Formular hidrogéis contendo lipossomas com atividade biológica anteriormente verificada (Capítulo V);
- Avaliar a atividade antibacteriana dos hidrogéis contendo lipossomas produzidos (Capítulo V);
- Avaliar a eficiência de liberação de lipossomas da malha polimérica do hidrogel (Capítulo V).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Lista de reagentes

- Acetato de cobre (Êxodo, Brasil);
- Acetona P.A. (CRQ, Brasil)
- Ácido acético glacial (Merck, Alemanha);
- Ácido clorídrico (Vetec, Brasil);
- Ácido gálico (Dinâmica, Brasil);
- Ácido sulfúrico (Vetec, Brasil);
- Agarose (LN Biotec, Brasil);
- Água destilada tipo III (Gehaka, Brasil);
- Água ultrapura tipo I (Gehaka, Brasil);
- Álcool etílico hidratado 92,8° (Itajá, Brasil);
- Álcool etílico hidratado 96° (CHEMCO, Brasil);
- Álcool isopropílico (Merck, Alemanha);
- Álcool metílico P.A. (Impex, Brasil);
- Anfotericina B (Sigma-Aldrich, EUA);
- Antibióticos Penicilina e Estreptomicina (Gibco, EUA);
- Azul de tripano (Merck, Alemanha);
- Cloreto de alumínio (Dinâmica, Brasil);
- Cloreto de ferro II (Vetec, Brasil);
- Cloreto de sódio (Synth, Brasil);
- Clorofórmio (CRQ, Brasil);
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Co., EUA);
- DPPH (Sigma-Aldrich, EUA);
- Eosina amarelada (Dinâmica, Brasil);
- Extran<sup>®</sup> (Millipore Corporation, EUA);
- Gelatina em pó (Dinâmica, Brasil);
- Glicose anidra PA (Vetec, Brasil);
- Glutamina (Dinâmica, Brasil);
- Hematoxilina (Dinâmica, Brasil);
- Hexano (Sigma-Aldrich, EUA);

- Hidróxido de amônio (Vetec, Brasil);
- Hidróxido de sódio (Neon, Brasil);
- Hipoclorito de sódio (Biocloro, Brasil);
- Lecitina de soja (Saint Charbel, Brasil);
- Magnésio metálico (Dinâmica, Brasil);
- Meio de cultura básico Luria Bertani-LB (Sigma-Aldrich, EUA);
- Meio de cultura DMEM (Meio Eagle Modificado por Dulbecco, Sigma-Aldrich Co., EUA);
- MTT (3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Invitrogen, EUA);
- Hidroclorito de Quinina (Dinâmica, Brasil);
- Quitosana 95% desacetilada (Polymar, Brasil);
- Penicilina e Estreptomicina (Gibco, EUA);
- Reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, EUA);
- Soro fetal bovino (Gibco, EUA);
- Tampão fosfato salina (Amaresco, EUA);
- Tripsina-EDTA (0,25 e 0,02%) (Gibco, EUA);
- Tween 80 (Sigma-Aldrich, EUA);
- Vanilina (Dinâmica, Brasil).

### **3.2. Lista de materiais**

- Almofariz e pistilo de porcelana;
- Balão de vidro de fundo redondo;
- Balão volumétrico de 5, 10 e 25 mL;
- Barca para pesagem;
- Barra magnética;
- Bisturi (ABC instrumentos cirúrgicos, Brasil);
- Câmara de Neubauer (modelo espelhada, C. A. Hausser & Son, EUA);
- Canetas permanentes coloridas (Pilot, Japão);
- Célula capilar descartável de policarbonato (modelo DTS1070, Malvern, Reino Unido);
- Cubeta de poliestireno descartável de 1,5 mL (modelo 1948, Kartell, Itália);
- Espátulas tipo canaletas e colher (Laborglas, Brasil);
- Filme plástico de uso laboratorial (Parafilm M<sup>®</sup>, American National 26 Can, EUA);
- Filtros de centrífuga Amicon<sup>®</sup> de 3 kDa (Ultra 0,5 mL - Millipore, Alemanha);

- Fita autoclave para processo de esterilização a vapor (Eurocel, Brasil);
- Forma de silicone 5 × 5 cm;
- Frascos de cultura (tpp, Alemanha);
- Frasco de plástico tipo Béquer com capacidade para 100, 250 e 1000 mL (JProlab, Brasil);
- Frasco de vidro tipo Béquer com capacidade para 5, 50, 250 e 500 mL (Qualividros, Brasil);
- Frascos do tipo Erlenmeyer com capacidade de 10, 50, 100, 200 e 500 mL (Phox, Brasil);
- Funil de vidro (JProlab, Brasil);
- Garrafas de cultura 25 cm<sup>2</sup> e 75 cm<sup>2</sup> (TPP, Alemanha);
- Lâmina de bisturi (Wiltex, China);
- Lâmina de vidro ponta fosca 26 × 76 mm espessura 1-1,2 mm (Carvalhoes, Brasil);
- Lamínula de vidro retangular 24 × 60 mm (Galvani, Brasil);
- Luva para procedimento não cirúrgico (Super Max, Malásia);
- Membrana de diálise com massa molecular de exclusão de 12 - 14 kDa (ThomasSci, EUA);
- Mica muscovita;
- Microplaca de aço inoxidável;
- Microtubos de polipropileno do tipo *ependorf* de 1,5 mL (Olen, China);
- Microtubos de polipropileno do tipo *ependorf* de 2,0 mL (Global trade, Brasil);
- Papel alumínio (Wyda pratic, Brasil);
- Papel branco A4 (One, Brasil);
- Papel crepado tratado e adesivo à base de resina e borracha (3M, Brasil);
- Papel filtro qualitativo 80 g (Unifil, Alemanha);
- Papel universal indicador de pH (Qualividros, Brasil);
- Peneira de plástico;
- Pinça clínica, anatômico dente de rato 12 cm (Laborglas, Brasil);
- Pinça invertida (LabSynth, Brasil);
- Pipeta de vidro 1 e 5 mL (Laborglas, Brasil);
- Pipetador mecânico;
- Placas de Petri descartáveis estéreis (JProlab, Brasil);
- Placa de microtitulação 96 poços (HS-YL-PM96C, Redplast, Brasil);
- Ponteiras de silício para microscópio de força atômica (Nanosensors, Suíça);
- Ponteiras de polipropileno brancas (0,1-10 µL) (Global trade, Brasil);
- Ponteiras de polipropileno amarelas (20-200 µL) (Global trade, Brasil);

- Ponteiras de polipropileno azuis (100-1000 µL) (Global trade, Brasil);
- Provetas de vidro com capacidade de 10, 100, 200 e 1000 mL (Pyrex, EUA);
- Tampa para placa de microtitulação (HS-YC-PTM, Redplast, Brasil);
- Tesoura cirúrgica 12 cm Reta Fina/Fina (LabSynth, Brasil);
- Tesoura Íris 12 cm Curva (ABC Instrumentos, Brasil);
- Tubos para centrifuga tipo Falcon 15 e 50 mL, com tampa rosca graduado (Alfa, Brasil).

### **3.3. Lista de equipamentos**

- Agitador magnético com aquecimento (LUCA-01/09-E, Lucadema, Brasil);
- Agitador magnético com aquecimento (Q261, Quimis, Brasil);
- Agitador magnético tipo vórtex (Genie 2, Genie, EUA);
- Agitador orbital Shaker (modelo MA830, Marconi, Brasil);
- Analisador Termogravimétrico (modelo DTG-60H, Shimadzu, Japão);
- Ar condicionado (Carrier, EUA);
- Autoclave de bancada (Idealclave 23 L, Brasil);
- Balança analítica (AG200, Gehaka, Brasil);
- Balança eletrônica de precisão (Q520-3, Quimis, Brasil);
- Banho de aquecimento (Luca 156/22, Lucadema, Brasil);
- Banho-maria quatro bocas microprocessado (Q334M, Quimis, Brasil);
- Banho ultratermostático (Q214M2, Quimis, Brasil);
- Biofotômetro (6131, Eppendorf, Alemanha);
- Bomba à vácuo (Q955B, Quimis, Brasil);
- Capela de exaustão de gases (Luca10, Lucadema, Brasil);
- Centrífuga refrigerada (Q222RM, Quimis, Brasil);
- Centrífuga refrigerada (5418 R, Eppendorf, Alemanha);
- Chapa de aquecimento (HPA2240M, Thermo Fisher Scientific, EUA);
- Condutivímetro (Q795M2, Quimis, Brasil);
- Espectrofotômetro UV-Vis (Q898U, Quimis, Brasil);
- Estufa de secagem e esterilização (Luca-81/81, Lucadema, Brasil);
- Estufa bacteriológica (Luca-81/81, Lucadema, Brasil);
- Evaporador rotativo microprocessado (Q344M2, Quimis, Brasil);
- Fluxo laminar unidirecional (FUH-18, Veco, Brasil);

- Freezer -20°C (CVU26EBBNA, Consul, Brasil);
- Freezer -40°C (FV500, Liotop, Brasil);
- Incubadora bacteriológica (Luca-81/81, Lucadema, Brasil);
- Incubadora *shaker* de bancada (Luca-222, Lucadema, Brasil);
- Leitora de microplacas (ELx808 IU, Biotek, EUA);
- Liofilizador de bancada horizontal (SL405, Solab, Brasil);
- Microcentrífuga refrigerada (5418R, Eppendorf, Alemanha);
- Micropipeta multicanal com capacidade de 200 µL (Discovery Comfort, HTL, Polônia);
- Micropipetas monocanais com capacidade de 2 µL, 10 µL, 200 µL, 1000 µL, 5000 µL e 10000 µL (LabMate Soft, HTL, Polônia);
- Microscópio biológico invertido trinocular (Q730TI-CF, Quimis, Brasil);
- Microscópio de força atômica (SPM-9600, Shimadzu, Japão);
- Microscópio confocal Raman Alpha 300 RA (WITec, Alemanha);
- Nano ZetaSizer (Nano ZS, Malvern, UK);
- Paquímetro digital (1108-150, Insize, Brasil);
- Refrigerador (Style Single door 34, Bosch, Alemanha);
- Refrigerador compacto (CRC12, Consul, Brasil);
- Sistema para ultrapurificação de água (Master WFI, Gehaka, Brasil);
- Turbidímetro de bancada (TB100, MS Tecnopon, Brasil);

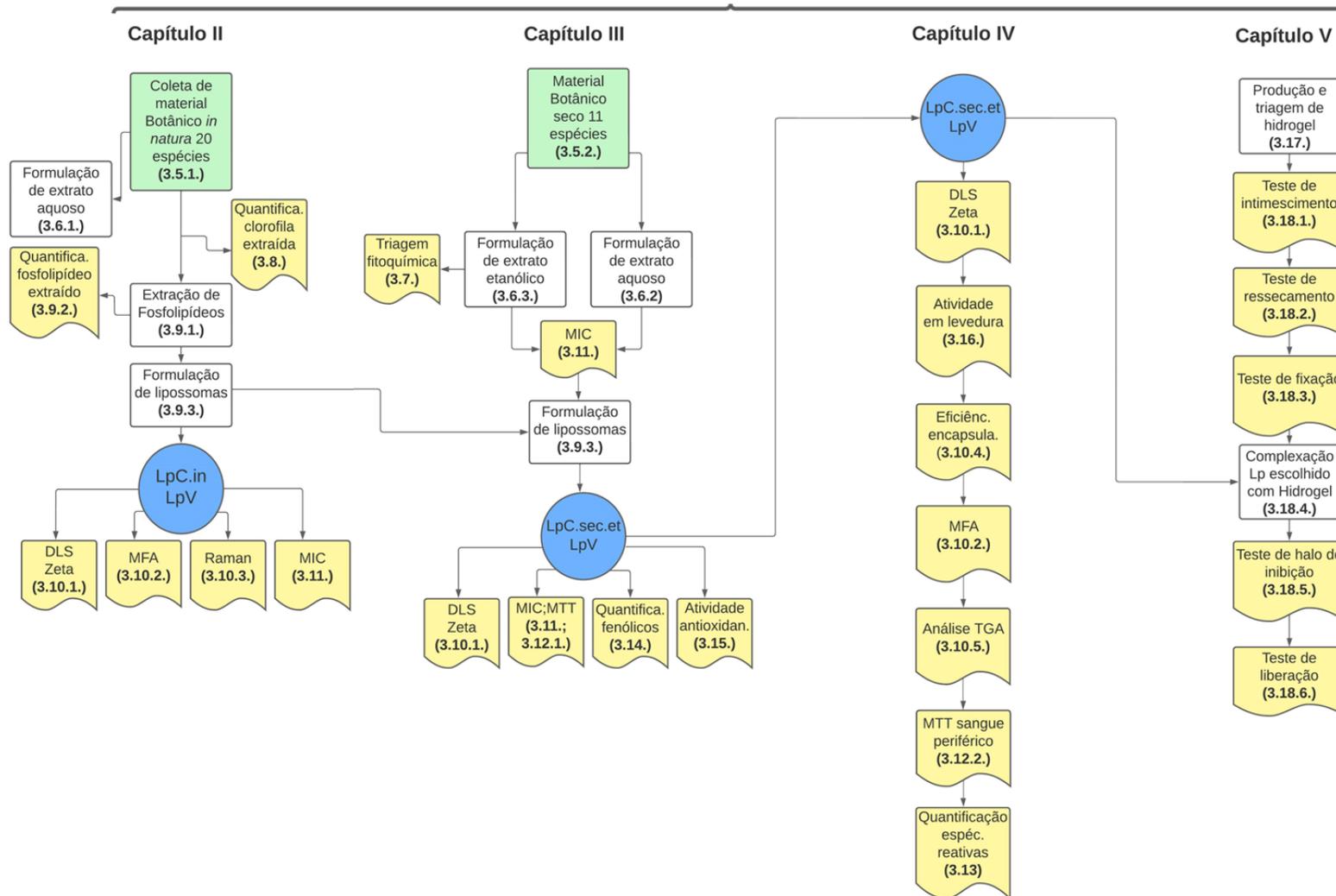
### 3.4. Delineamento da metodologia

No intuito de organizar a metodologia e Capítulos posteriores foi realizado um delineamento dos experimentos que foram conduzidos seguindo o fluxograma indicado na Figura I.7. Os retângulos em verde representam o início de todos os processos, por exemplo, a coleta de materiais botânicos; as marcações em amarelo representam etapas de caracterização; e os círculos em azul representam os lipossomas sintetizados. Os retângulos em branco representam atividades intermediárias realizadas.

A metodologia consiste basicamente em duas frentes, sendo uma na qual utiliza-se material botânico *in natura* e outra na qual utiliza-se material botânico seco. Essa troca do material botânico ocorreu em função de resultados preliminares obtidos que serão apresentados mais adiante.

Capítulo I

Referencial teórico e materiais e métodos



**Figura I.7** – Fluxograma com a metodologia aplicada em todo o estudo. Formas com coloração verde indicam início de processos; com coloração amarela representando etapas de caracterização; com coloração azul indicando nanossistemas produzidos; e com coloração branca representando etapas intermediárias.

Fonte: da autora.

### 3.5. Coleta de materiais botânicos

#### 3.5.1. Material botânico in natura

Os materiais botânicos *in natura* das espécies *Artemisia absinthium* (Losna), *Artemisia alba* (Cânfora), *Equisetum arvense* (Cavalinha), *Euphorbia tirucalli* (Avelós 2), *Euphorbia tulearensis* (Avelós 1), *Lavandula angustifolia* (Alfazema), *Ocimum gratissimum* (Alfavaca), *Origanum vulgare* (Orégano), *Pelargonium graveolens* (Malva rosa), *Perilla frutescens* (Manjerição roxo), *Symphytum officinale* (Confrei), *Tetradenia riparia* (Mirra), *Thymus vulgaris* (Tomilho), *Tropaeolum majus* (Capuchinha) e *Salvia officinalis* (Sálvia) foram coletadas em uma área protegida (Jardim Botânico de Brasília-JBB) conforme a permissão de pesquisa JBB: 007/2019 e os materiais botânicos das espécies: *Aloe arborescens* (Babosa), *Curcuma longa* (Açafrão), *Mimosa pudica* (Dormideira), *Plantago major* (Tansagem) e *Taraxacum officinale* (Dente-de-leão), e foram coletados na coleção de plantas aromáticas e medicinais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Todas as espécies têm autorização para atividades com finalidade científica emitida pelo SISBIO número: 74283-1 e comprovante de cadastro de acesso no SISGEN nº A078201. Os materiais botânicos coletados foram armazenados separadamente a -20°C até o uso. Esses materiais foram selecionados por apresentarem atividades biológicas de interesse para incorporação em hidrogel para futura aplicação tópica, como demonstra a Tabela I.1.

#### 3.5.2. Material botânico seco

Os materiais botânicos secos foram adquiridos comercialmente: açafrão da terra, cavalinha, malva rosa, manjerição, orégano, sálvia e tomilho e alfavaca (*Ocimum* spp.), alfazema (*Lavandula* spp.), confrei (*Symphytum* spp.), losna (*Artemisia absinthium*). As amostras que haviam o nome científico das espécies eram da marca “Produtos Melvina” e as demais do “Produtos Gizele”.

### 3.6. Preparação de extratos aquosos

#### 3.6.1. Preparo de extratos aquosos dos materiais botânicos in natura

As folhas e pecíolos coletados previamente congelados foram lavados utilizando detergente Extran® a 0,1% em água tipo III (destilada) por 2 min. Os materiais botânicos foram cortados em fragmentos com cerca de 4 mm<sup>2</sup> e então separadamente a cada material foi deixado em infusão em água tipo I (ultrapura) em ebulição até a concentração (p/v) de 100 mg/mL ser atingida seguindo de incubação durante 2 min. Finalmente, os extratos aquosos foram passados

através de papel de filtro com poros que permitem a retenção de partículas de 4 a 12  $\mu\text{m}$  e maiores.

### *3.6.2. Preparo de extratos aquosos a partir de material botânico seco*

Para o preparo de extratos aquosos a partir de material botânico previamente seco, 5 g do material botânico seco foram colocados em contato com 100 mL de água tipo I aquecida e deixados em ebulição por 2 min. Em seguida, o material foi macerado em temperatura ambiente por 24 h devidamente fechado. Após as 24 h a suspensão passou pelo processo de filtração utilizando papel de filtro com retenção de partículas maiores que 12  $\mu\text{m}$ .

Os extratos aquosos foram acondicionados em tubo tipo Falcon e colocados em congelador à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  e depois de 24 h acondicionados em temperatura de  $-50^{\circ}\text{C}$  por cerca de 48 h. Esses extratos passaram pelo processo de liofilização até a obtenção de um pó completamente seco. Esse pó foi ressuspense em água tipo I até uma concentração aproximada de 2,5 g/mL de extrato aquoso.

### *3.6.3. Preparo de extratos etanólicos/aquosos a partir do material botânico seco*

Para a preparação de extratos etanólicos/aquosos, 5 g de material botânico seco foram colocado em contato com 100 mL de solução etanólica 70% e deixados por 24 h incubados em temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  em recipiente devidamente fechado. Após as 24 h, a suspensão passou por processo de filtração utilizando papel de filtro com retenção de partículas maiores que 12  $\mu\text{m}$ .

Os extratos etanólicos obtidos a partir material botânico seco foram submetidos à rotaevaporação por 1 h em banho-maria a  $40^{\circ}\text{C}$  e banho ultratermostático de resfriamento serpentinado a  $10^{\circ}\text{C}$  e pressão de 500 mmHg. Em seguida, as soluções resultantes foram congeladas à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  e depois de 24 h colocados em temperatura de  $-50^{\circ}\text{C}$  por cerca de 48 h. Esses extratos passaram pelo processo de liofilização até a obtenção de um pó completamente seco. Após a liofilização, o pó foi ressuspense em apenas água tipo I até a concentração aproximada de 2,5 g/mL de material botânico seco. Esse extrato será mencionado adiante como extrato etanólico/aquoso.

### 3.7. Triagem fitoquímica

Os extratos etanólico/aquoso passaram por uma bateria de reações para averiguar a possível presença de metabólitos secundários conforme a metodologia previamente descrita por Cunha (2009), com grupos fitoquímicos e reações detalhados na Tabela I.2. A caracterização envolveu antraquinonas, flavonoides, saponinas e taninos. Compostos padrão foram empregados como controles positivos para validação das reações.

**Tabela I.2** – Reações de identificação para triagem fitoquímica.

<b>Grupo fitoquímico</b>	<b>Reações realizadas</b>	<b>Referências</b>
Antraquinonas	Reação de Bornträger direta Reação de Bornträger indireta Precipitação de cloreto férrico	Silva, R.A.D. 1926; Cunha, A.P. 2009.
Flavonoides	Reação de Shinoda Reação de cloreto de alumínio Precipitação de cloreto férrico Caracterização de antocianos	Anvisa, 1996; Cardoso, C.M.Z. 2009.
Saponinas	Caracterização da formação de espuma Caracterização da formação de espuma resistente	Wagner, H., Bladt, S. 1996; Simões, C.M.O. et al., 2007.
Taninos	Reação de cloreto férrico Reação de proteínas Precipitação de alcaloides Reação com acetato de cobre Reação para taninos condensados	Cunha, A.P. 2009; Simões, C.M.O. et al., 2007.

#### 3.7.1. Antraquinonas

Para a reação de antraquinonas foi utilizado como controle positivo a espécie padrão cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana* córtex) e controle negativo apenas água. A reação de Bornträger direta foi realizada utilizando extrato etanólico/aquoso. 5 mL do extrato foram adicionados em 3 mL de hexano e extraída a fase orgânica. Na fase orgânica foram adicionados 2 mL solução de hidróxido de amônio 10%, e o desenvolvimento da cor vermelha ou violeta indicava a presença de antraquinonas livres no extrato vegetal.

Para a reação de Bornträger indireta, 5 mL do extrato etanólico/aquoso foram colocados em contato com 1 mL de ácido clorídrico 10% e essa solução passou por fervura durante 3 min e após resfriamento a mesma passou por extração com 1 mL de hexano. A fase aquosa foi

retirada e adicionado 1 mL de solução de hidróxido de amônio 10%, sendo observado o desenvolvimento da coloração vermelha ou violeta, na fase aquosa, indicativo da presença de antraquinonas livres no extrato vegetal.

Por fim, para reação de precipitação de cloreto férrico utilizou-se a mesma solução ácida obtida na reação de Borntrager indireta na qual foram adicionados 2 mL de solução de cloreto férrico 10%, essa solução foi mantida em ebulição por 3 min e após resfriamento a mesma passou pelo processo de extração com 2 mL de hexano. A fase orgânica foi retirada e adicionados 2 mL de solução de hidróxido de amônio 10%, sendo observada a ocorrência do desenvolvimento de cor vermelha ou violeta indicativa da presença de antraquinonas livres no extrato vegetal.

### 3.7.2. *Flavonoides*

Para a reação de flavonoides foi utilizado como controle positivo a espécie padrão camomila (*Matricaria chamomilla*). As reações utilizaram o extrato etanólico/aquoso. A reação de Shinoda foi realizada sob banho de gelo, dois fragmentos de magnésio metálico (2 × 2 mm) foram adicionados a 2 mL da solução de extrato e lentamente foi adicionado 1 mL de ácido clorídrico concentrado, sendo que a formação de coloração avermelhada foi indicativa da presença de flavonas ou flavonóis no extrato vegetal.

Para a reação de cloreto de alumínio foram adicionadas duas gotas do mesmo extrato etanólico/aquoso em papel filtro em lugares diferentes, sendo que sobre uma das gotas foi adicionada solução alcoólica de cloreto de alumínio 1% e observada sob luz ultravioleta, sendo que a intensificação da fluorescência foi indicativa da presença de flavonoides no extrato vegetal.

Para a reação de cloreto férrico, 4 gotas da solução alcoólica de cloreto férrico 25% foram adicionadas a 2 mL dos extratos etanólicos/aquosos, sendo que o desenvolvimento da coloração azul, verde, marrom ou vermelha indicou a presença de compostos fenólicos.

Para a reação de caracterização de antocianos, 10 mL dos extratos etanólicos/aquosos foram utilizados. Os extratos foram alcalinizados com auxílio de solução de hidróxido de sódio 5% até atingir o pH 10 e após acidificados com auxílio da solução de ácido clorídrico 10% até atingir o pH 3, sendo que a alteração de cor com a variação de pH para vermelho (ácido) ou azul (básico) indicou a presença de compostos fenólicos.

### 3.7.3. Saponina

Para a caracterização de saponinas foi utilizada como controle positivo a espécie padrão salsaparrilha (*Smilax ssp.*). O primeiro ensaio “caracterização de formação de espuma” consistia em agitar vigorosamente 2 mL dos extratos etanólicos/aquosos e comparar com um tubo que continha 2 mL água e sabão em barra comum. O segundo ensaio consistia em após 10 min do primeiro ensaio adicionar 3 gotas de ácido sulfúrico 20% sendo a formação de espuma persistente à adição do ácido indicativo da presença de saponinas no extrato vegetal.

### 3.7.4. Taninos

Para a caracterização de taninos na amostra foi utilizado como controle positivo o extrato aquoso de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). Para a reação de cloreto férrico em 2 mL de extrato etanólico/aquoso (amostra) foram adicionadas 3 gotas de solução alcoólica de cloreto férrico 2% e agitado bem, sendo que o desenvolvimento de cor esverdeada, azulada ou cinza indica a presença de compostos fenólicos no extrato vegetal. Na reação de proteínas em 2 mL de extrato foram adicionadas 2 gotas de ácido clorídrico 10% e depois gotejada solução de gelatina 2,5%, sendo observado o aparecimento de precipitado indicativo da presença de taninos no extrato vegetal.

A reação de precipitação de alcaloides também utilizou 2 mL de extratos, depois foram adicionadas 4 gotas de solução alcoólica de quinina 8%, sendo que a turvação da amostra ou formação de precipitado indica a presença de taninos na solução. Para a reação de acetato de cobre, foram gotejados (cerca de 3 gotas) de solução de acetato de cobre 3% em 2 mL de extrato, sendo o aparecimento de turvação ou precipitado também indicativo da presença de taninos na solução. Por fim, para a reação de taninos condensados, 2 mL de extrato foram adicionados a 0,5 mL de solução alcoólica de vanilina 1% e depois acrescido 1 mL de ácido clorídrico concentrado, sendo que o desenvolvimento de cor vermelha indica a presença de taninos condensados no extrato vegetal.

## 3.8. Quantificação da clorofila

No intuito de quantificar a concentração de clorofila total extraída, 0,25 g de cada material botânico *in natura* foi embebido em 25 mL de acetona P.A. Nos intervalos de tempo de 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 3; 4; 20; 24; e 48 h, alíquotas de 100 µL dos sobrenadantes foram recolhidas e diluídas na proporção de 1:10 em água tipo I, adicionadas em cubeta e realizada

leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 633 e 645 nm. Para calcular a concentração utilizou-se a fórmula (Arnon, D.I. 1949):

$$Ct = (20,2 \times A_{633}) + (18,2 \times A_{645}) \times \frac{0,25}{0,025} \times 10$$

Onde Ct é concentração total de clorofila;  $A_{633}$  é a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 633 nm; e  $A_{645}$  é a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 645 nm. Os valores finais são referentes às suas diluições, 0,25 g de folha em 0,025 L de acetona. A multiplicação por 10 refere-se a alíquota que foi diluída 10× antes da leitura no espectrofotômetro.

Para que não houvesse oxidação dos fosfolipídeos, o experimento foi mantido durante o período de 48 h à temperatura de 4°C. Para que toda a clorofila fosse extraída e o processo não fosse comprometido pela saturação do líquido extrator (acetona), após a retirada da alíquota do tempo de 20 h, houve a filtração e o mesmo volume de acetona foi adicionado para extração exaustiva. E para que não houvesse falha nos cálculos a partir deste tempo, os valores de absorvância obtidos no tempo de 20 h foram adicionados nas leituras de 24 e 48 h. A quantificação de clorofila extraída foi realizada com todas as espécies coletadas.

### **3.9. Formulação de nanomateriais**

#### *3.9.1. Extração de fosfolipídeos*

Para extrair fosfolipídeos de células vegetais foi necessária uma modificação dos protocolos previamente conhecidos com patente depositada BR 10 2015 002069 4 e WO2016/119030 A1 (Silva, L.P., Bonatto, C.C., Joanitti, G.A. 2015) para extração de fosfolipídeos utilizando solventes orgânicos devido à presença de clorofila nos materiais vegetais. Toda extração de fosfolipídeos aconteceu único e exclusivamente dos materiais botânicos coletados *in natura*. Inicialmente, as folhas e pecíolos que estavam armazenados à -20°C foram deixados à temperatura ambiente durante 5 min e depois disso, os materiais biológicos inteiros foram incubados em acetona P.A. a 4°C por 24 h com uma substituição de solvente durante o processo (20 h) para extração exaustiva. Após esse período, os materiais biológicos foram cuidadosamente removidos e acondicionados em um almofariz, onde o material botânico foi submetido a um processo de maceração com pistilo até obter um

pulverizado de material botânico fino. Primeiramente, 1 g de material botânico pulverizado foi adicionado em um tubo tipo Falcon e depois foram adicionados os solventes separadamente na seguinte ordem: 2 mL de água tipo I, 2,78 mL de clorofórmio, 5,2 mL de metanol, 2,78 mL de clorofórmio e 2,78 mL de água tipo I, sendo que após a adição de cada solvente, o tubo Falcon foi mantido em agitador tipo vórtex por 5 min. Após a extração com solventes o material foi centrifugado por 5 min a 3282 g, à temperatura de 5°C e retirada a fase orgânica. A fase orgânica foi submetida à rotaevaporação por 1 h em banho-maria a 40°C e banho ultratermostático de resfriamento serpentinado com destilador a 10°C e pressão de 500 mmHg, para evaporação completa do clorofórmio e conseqüentemente formação do filme lipídico.

### *3.9.2. Quantificação dos fosfolipídeos extraídos*

O método de turbidez, ou seja, o método nefelométrico, foi utilizado para quantificação de fosfolipídeos. Esse método quantifica os fosfolipídeos presentes em uma amostra pela determinação do teor de fósforo total, baseado na insolubilidade de fosfolipídeos em acetona. Para isso, foi produzida uma curva de calibração, por meio da dispersão de lecitina de soja em acetona por diluição seriada nas concentrações de 0,07; 0,015; 0,03; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 mg/mL. Assim, a leitura da unidade de turbidez nefelométrica (NTU) de cada amostra foi registrada coletando 3 leituras de cada diluição. O valor NTU para o branco (acetona) foi subtraído da leitura de cada amostra. O filme lipídico obtido na etapa anterior (Subtópico 3.9.1) foi suspenso com acetona na concentração de 15 mg de material botânico para cada 1 mL de acetona. As amostras para a curva padrão foram agitadas manualmente por cerca de 10 s, e foram colocadas em frascos limpos e avaliadas em turbidímetro. A concentração de fósforo foi estimada diretamente a partir de uma correlação de NTU com a concentração na curva de calibração (Sinram, R.D., 1986; Wang, T. Zhou, D., 2017).

### *3.9.3. Formação de lipossomas*

Para o desprendimento do filme e conseqüente nanoestruturação dos fosfolipídeos extraídos foram adicionados 1 mL de água tipo I (lipossoma vazio - LpV) ou 1 mL de extrato (lipossoma cheio - LpC) de cada espécie, sempre adicionando o extrato referente à mesma espécie de planta da qual os fosfolipídeos foram extraídos, conforme demonstra a Tabela I.3. Após a adição desses volumes, o balão de fundo redondo foi mantido em agitador tipo vórtex

por 10 min. Então, as suspensões contendo os lipossomas foram transferidos para microtubos e armazenados a 4°C.

**Tabela I.3** – Lipossomas produzidos durante todas as etapas do presente estudo.

Nome científico	Nome popular	Lipossomas vazios (LpV) contendo apenas água tipo I	Lipossomas contendo extrato <i>in natura</i> (LpC.in)	Lipossomas contendo extrato etanólico/aquoso a partir de material botânico seco (LpC.sec.et)
<i>Aloe arborescens</i>	Babosa	•	•	∅
<i>Artemisia absinthium</i>	Losna	•	•	•
<i>Artemisia alba</i>	Cânfora	•	•	∅
<i>Curcuma longa</i>	Açafrão	•	•	•
<i>Equisetum arvense</i>	Cavalinha	•	•	•
<i>Euphorbia tirucalli</i>	Avelós 2	•	•	∅
<i>Euphorbia tullearensis</i>	Avelós 1	•	•	∅
<i>Lavandula angustifolia</i>	Alfazema	•	•	•
<i>Mimosa pudica</i>	Dormideira	•	•	∅
<i>Ocimum gratissimum</i>	Alfavaca	•	•	•
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	•	•	•
<i>Pelargonium graveolens</i>	Malva rosa	•	•	•
<i>Perilla frutescens</i>	Manjeriçã roxo	•	•	•
<i>Plantago major</i>	Tansagem	•	•	∅
<i>Salvia officinalis</i>	Sálvia	•	•	•
<i>Symphytum officinale</i>	Confrei	•	•	•
<i>Taraxacum officinale</i>	Dente-de-leão	•	•	∅
<i>Tetradenia riparia</i>	Mirra	•	•	∅
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho	•	•	•
<i>Tropaeolum majus</i>	Capuchinha	•	•	∅

• se refere que o lipossoma foi produzido e ∅ se refere que o lipossoma não foi produzido.

### 3.10. Caracterização dos lipossomas

3.10.1. Diâmetro hidrodinâmico (DH) e índice de polidispersividade (PdI) obtidos por espalhamento de luz dinâmico, potencial Zeta (pZ) e condutividade elétrica (Cnd-ME) obtidos por mobilidade eletroforética

Amostras de lipossomas e seus respectivos controles foram diluídos 10× em água tipo I, separadamente. As amostras diluídas foram analisadas utilizando um equipamento ZetaSizer Nano ZS com o módulo de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para determinação do DH, que inclui o diâmetro seco da nanoestrutura acrescido da sua camada de solvatação, e o PdI, que oferece informações sobre a uniformidade e/ou dispersividade) das nanoestruturas.

Posteriormente, o pZ e Cnd-ME foram determinados utilizando outro módulo do equipamento (mobilidade eletroforética), sendo esta a primeira medida que se relaciona à estabilidade coloidal dos lipossomas.

Para análise por DLS, o ângulo de leitura aplicado foi de 173° utilizando um laser de hélio-neônio (4 mW) operando a 633 nm, sendo obtidas três medidas (replicatas) de cada amostra em modo automático a 25°C. Já para o pZ e Cnd-ME foram obtidas três aquisições em modo manual com 20 leituras para cada replicata.

### 3.10.2. Microscopia de força atômica (MFA)

A forma (topografia) e o tamanho (altura em Z) dos lipossomas foram avaliados utilizando um microscópio de força atômica comercial SPM-9600. As amostras foram diluídas 100× e aplicadas sobre uma camada de mica muscovita recém-clivada. Para obtenção das imagens foram realizadas varreduras em orientação XY, que abrangiam áreas variando de 5 × 5 a 40 × 40 μm<sup>2</sup> com uma taxa de varredura de 1 Hz, com uma ponteira de silício cônica integrada a um cantilever retangular com frequência de ressonância de cerca de 250 kHz. Para o ajuste das imagens o *software* SPM-9600 em modo *offline* foi utilizado, com ajuste automático de plano no eixo X, correção de linhas no eixo X e de *background*.

### 3.10.3. Espectroscopia Raman

Os lipossomas contendo água (LpV) ou extratos (LpC) foram depositados separadamente em uma microplaca de aço inoxidável com 20 deposições sucessivas de 1 μL, seguidas de secagem, em cada *spot*. As análises foram realizadas utilizando um microscópio confocal Raman Alpha 300 RA acoplado com um módulo laser de diodo TOPTICA SYS XTRA 785 nm e 300 mW. Todas as amostras (LpV e LpC) foram analisadas nas condições do modo de aquisição de espectro único utilizando lente objetiva 100×, filtro de 785 nm, câmera de dispositivo acoplado de carga (CCD) à temperatura de -60°C, tempo de integração de 0,2 s e com 100 acumulações. Foram analisadas pelo menos 3 regiões distintas em cada amostra e foram calculadas as médias para gerar cada espectro final.

### 3.10.4. Determinação da eficiência de encapsulamento (EE) de extratos dos lipossomas

Para avaliar a EE, 500 μL de lipossomas vazios, de lipossomas contendo os extratos etanólicos/aquosos e dos extratos vegetais foram submetidos a ultrafiltração em filtro Amicon®

com limite de exclusão de 3 kDa. A centrifugação passou por 3 etapas, todas a 5°C, a primeira foi a 268 g por 30 min, seguido de 30 min a 1073 g e por fim mais 60 min a 2415 g.

Para a construção de uma curva de calibração, os extratos etanólicos/aquosos ultrafiltrados foram diluídos seriadamente a partir da condição de diluição 1:2 aplicada na formação de lipossomas (40 mg/mL) até uma diluição de 1:128, utilizando um fator de diluição de 2. Para avaliar a precisão e repetibilidade e calcular o desvio padrão da média, três leituras independentes de cada amostra foram obtidas. Todas as leituras foram realizadas a 22°C.

Para calcular a EE, o conteúdo ultrafiltrado dos lipossomas vazios e cheios foram diluídos 5 vezes, e a leitura da condutividade elétrica (Cnd) foi realizada em condutímetro microprocessado, sempre na temperatura de 22°C. A quantificação da EE foi realizada correlacionando a leitura obtida, ajustada pelos valores obtidos da condutividade da água tipo I e do filtrado dos lipossomas vazios, ambos multiplicados pelo fator de diluição. Este valor foi então aplicado à equação da reta obtida com a curva padrão para extrato de cada espécie.

#### 3.10.5. Análise Termogravimétrica (TGA)

A avaliação da estabilidade térmica dos lipossomas foi realizada com auxílio de um analisador termogravimétrico. Para isso, foi observado comportamento da variação de massa dos materiais resultante do aumento gradual da temperatura. As amostras líquidas de lipossomas foram aquecidas de temperatura ambiente até 600°C a uma taxa de 10°C/min sob atmosfera de nitrogênio inerte (vazão de 50 mL/min). Os estudos foram desenvolvidos com 10 mg de amostras que foram colocados em cadinhos de platina. Para analisar particularmente a detecção dos picos de degradação máxima das amostras a derivada da curva de perda de massa foi obtida com auxílio do *software* SciDAVis.

### 3.11. Ensaio de atividade antibacteriana

Colônias isoladas de *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram inoculadas em meio Luria-Bertani (LB) líquido, separadamente, e mantidas a 37°C, 120 rpm *overnight* em incubadora *shaker* de bancada. Em seguida, os meios de cultura com as bactérias foram diluídos em meio líquido LB até a densidade óptica (OD<sub>600</sub>) de 0,05. Para testar a possível citotoxicidade dos extratos e lipossomas contra *E. coli* e *S. aureus*, as concentrações das amostras utilizadas foram de 0,256; 0,128, 0,064; 0,032 e 0,016 mg/mL quando se tratava de extrato e lipossomas a partir do material botânico *in natura* e de 250

mg/mL quando se tratava de extrato e lipossomas a partir do material botânico seco. Como controle positivo, foram utilizadas penicilina e estreptomicina nas concentrações de 100 U/mL e 100 µg/mL, respectivamente; e como controle negativo apenas água tipo III autoclavada. As bactérias foram adicionadas em microplacas e assim incubadas a 37°C em estufa bacteriológica, com inspeção visual nos tempos 0, 24, 48 e 72 h.

Nas amostras de extratos e lipossomas a partir do material botânico seco, após 24 h da incubação em microplaca, a avaliação por microgota foi conduzido adicionando 2 µL de cada suspensão foram inoculados em meio LB-ágar (sólido) para análise do possível crescimento bacteriano nas mesmas condições anteriores por mais 48 h.

### **3.12. Teste de viabilidade em linhagens celulares de mamíferos**

O ensaio colorimétrico de redução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio) é um método clássico para medir a atividade metabólica celular, sendo assim um indicador de viabilidade e proliferação celular (Liu e Nair., 2010; Santos, L.L.R. et al., 2004).

#### *3.12.1. Teste de viabilidade com células isoladas*

Células J774A.1 é uma linhagem celular isolada em 1968 da ascite de camundongo fêmea adulta com sarcoma de células reticulares. As células aderentes J774A.1 (ATCC TIB-67) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB); antibióticos penicilina e estreptomicina nas concentrações de 100 U/mL e 100 µg/mL; respectivamente; e antifúngico anfotericina B na concentração de 25 µg/mL, em estufa umidificada a 37°C até a obtenção de confluência (Gragnani, A. Morgan, J.R. Ferreira, L.M., 2002). Para o ensaio, as células foram gentilmente destacadas utilizando um espalhador de células em superfície gelada. Em seguida, as células foram contadas utilizando uma câmara de Neubauer e solução de azul de tripano 1%. Um total de  $1 \times 10^4$  células foram incubadas por poço com os lipossomas e extratos aquosos e etanólicos/aquosos na concentração de 250 mg/mL diluídos em meio de cultura. Após 24 h de incubação, o meio foi removido cuidadosamente e o MTT previamente diluído em tampão fosfato salina (PBS) foi adicionado e seguido de incubação por 2 h. Posteriormente, 100 µL de dimetil sulfoxido (DMSO) foram adicionados por poço e a absorbância foi medida a 630 nm utilizando um espectrofotômetro (Monsmann, T., 1983). Os controles utilizados foram o meio com PBS (controle negativo, foi

considerado 100% de viabilidade) e meio com DMSO (controle positivo) ambos no mesmo volume aplicado que as amostras (Supino, R. 1995).

### *3.12.2. Teste de viabilidade celular com sangue periférico bovino*

Foram coletadas 5 amostras de diferentes espécimes de bovinos, com auxílio de um tubo *vacutainer* contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) de acordo com a autorização da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) nº 1915290721 da Embrapa Gado de Leite. A fração da camada leucocitária foi separada e conduzido um processo de lise das hemácias na proporção de 1:5 (tampão de lise: sangue) por 5 min. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS e foram ressuspensas com 1 mL de meio DMEM completo, contendo 10% de SFB e antibióticos penicilina e estreptomicina na concentração de 100 U/mL e 100 µg/mL, respectivamente.

Em seguida, as células foram contadas utilizando câmara de Neubauer e solução de azul de tripano a 1%. Foram adicionadas  $5 \times 10^5$  células por poço, em microplacas de 96 poços, com lipossomas e extratos nas concentrações de 250, 25 e 2,5 mg/mL, e incubadas estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 72 h. Após esse tempo, as microplacas foram centrifugadas por 10 min a 1440 rpm e o sobrenadante foi removido e armazenado para testes posteriores. Cerca de 200 µL de meio DMEM completo com 10% de MTT foram adicionados em cada poço e as microplacas foram incubadas por mais 4 h em estufa, nas mesmas condições, ao abrigo da luz em papel alumínio.

Mais uma vez, as microplacas foram centrifugadas por 10 min a 1440 rpm, o meio foi removido e foram adicionados 200 µL de isopropanol-ácido (0,04 M de HCl em isopropanol). As células foram ressuspensas e incubadas, novamente, em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> por 1 h, ao abrigo da luz em papel alumínio. Por fim, as microplacas foram submetidas a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Como controle negativo, utilizou-se PBS, e como controle positivo foi utilizado forbol 12-miristato 13- acetato (PMA).

### **3.13. Quantificação de espécies reativas**

O reagente de Griess foi preparado utilizando 800 µL de uma solução 0,1% de dicloridrato de naftil-1-N etilenodiamina juntamente com 800 µL de uma solução contendo 1% de ácido sulfanílico e 5% de ácido fosfórico. Esse reagente foi preparado e armazenado a 4°C até o momento de uso.

Uma solução padrão de nitrito foi diluída em água deionizada para obter as concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625  $\mu\text{M}$ , sendo que essas soluções foram preparadas em duplicatas.

Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 130  $\mu\text{L}$  de água deionizada, 20  $\mu\text{L}$  de reagente de Griess e 150  $\mu\text{L}$  de amostra (que poderia ser a solução padrão ou sobrenadante armazenado no teste de viabilidade celular com sangue periférico). Esta microplaca foi mantida ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, por 30 min e, por fim, foi realizada a leitura em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 548 nm.

### **3.14. Quantificação de compostos fenólicos totais**

Para a quantificação de compostos fenólicos totais foi realizado o ensaio espectrofotométrico a partir do padrão de ácido gálico, o qual foi utilizado na concentração de  $1 \times 10^{-4}$  mol/L na presença do reagente Folin-Ciocalteu. A reação ocorreu com 130  $\mu\text{L}$  de água tipo I, 20  $\mu\text{L}$  de amostra, 50  $\mu\text{L}$  de reagente de Folin-Ciocalteu e 100  $\mu\text{L}$  de solução de carbonato de sódio 20%. Essa reação é baseada em reações de transferência de elétrons entre o reagente e a substância fenólica. As substâncias fenólicas reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu promovendo a mudança da cor amarela original para azulada/roxo. A coloração azul é relativamente estável e diretamente proporcional à quantidade de substâncias redutoras presente na reação, assim é possível, mediante uma curva padrão previamente definida do padrão ácido gálico, quantificar a concentração de compostos fenólicos presentes na amostra. As amostras foram aplicadas entre as concentrações de 0,08 a 0,16 g/mL a fim de que a concentração de fenólicos estivesse dentro da curva padrão. A amostra e reagente foram mantidos em contato por 30 min e após esse tempo a leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 630 nm. A concentração foi correlacionada ao equivalente em ácido gálico em cada 100 g de amostra, levando em consideração a quantidade de material botânico seco e posteriormente diluído na formulação do extrato.

### **3.15. Ensaio de atividade antioxidante DPPH**

Para o ensaio de atividade antioxidante foi utilizado o padrão ácido gálico como controle positivo (na concentração final de 0,0017 mg/mL) e metanol como controle negativo. A medida da atividade antioxidante foi realizada utilizando-se o método espectrofotométrico de DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) adaptado, sendo expressa em porcentagem de inibição da

reação, sendo que a reação realizada em presença de metanol considerada como não havendo inibição. As amostras foram aplicadas em diferentes concentrações (0,086 a 1,300 mg/mL) a fim de manter dentro da concentração de inibição do DPPH. As amostras e controles foram incubadas com 450 µL DPPH (0,06 mM) e agitadas a fim de manter a homogeneidade e mantidas ao abrigo de luz por 60 min. Após esse tempo foi realizada uma leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm. A absorbância (Abs) medida foi correlacionada aos controles a fim de possibilitar a quantificação da porcentagem de inibição do DPPH. O DPPH apresenta cor violeta-escuro e após reação com substância antioxidante torna-se mais claro chegando até a coloração amarela. Por isso para calcular a porcentagem de inibição foi seguida a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{Abs DPPH} - \text{Abs amostra})}{\text{Abs DPPH} \times 100}$$

### 3.16. Ensaio de atividade em levedura

Colônias isoladas de *Saccharomyces cerevisiae* (1VVT97) foram inoculadas em meio líquido de extrato de levedura peptona dextrose (YEPD) contendo 10% de extrato de levedura (m/v), 20% de peptona (m/v), 20% de dextrose (m/v), e mantidas a 28°C, 120 rpm *overnight* em incubadora *shaker* de bancada. Em seguida, a cultura de *S. cerevisiae* foi diluída em meio líquido YEPD até a densidade óptica (OD<sub>600</sub>) de 0,05. Para testar a possível citotoxicidade dos extratos e lipossomas contra *S. cerevisiae*, as amostras obtidas a partir do material botânico seco foram aplicadas na concentração de 250 mg/mL. Como controle positivo, foi utilizada anfotericina B na concentração de 25 µg/mL e como controle negativo apenas água tipo III autoclavada. Após incubação por 24 e 48 h em meio líquido nas microplacas, 2 µL de cada amostra foram adicionadas em meio YEPD-ágar (sólido) e assim novamente incubados a 28°C em estufa bacteriológica, com inspeção visual nos tempos 0, 24 e 48 h. Os testes foram realizados em triplicatas.

### 3.17. Produção e triagem de hidrogel

Foram produzidos 5 hidrogéis com diferentes concentrações finais de carboximetilcelulose e concentração de agarose mantida constante:

Hidrogel 1: 0,5% (m/v) de carboximetilcelulose e 3% (m/v) de agarose;

Hidrogel 2: 1% (m/v) de carboximetilcelulose e 3% (m/v) de agarose;

Hidrogel 3: 1,5% (m/v) de carboximetilcelulose e 3% (m/v) de agarose;

Hidrogel 4: 2,0% (m/v) de carboximetilcelulose e 3% (m/v) de agarose;

Hidrogel 5: 2,5% (m/v) de carboximetilcelulose e 3% (m/v) de agarose;

Os biopolímeros carboximetilcelulose e agarose foram misturados em 5 mL de água tipo III e deixados em agitação com aquecimento até a completa dissolução. Após esse tempo, os hidrogéis foram agitados com barra magnética e colocados em formas de silicone de 5 cm<sup>2</sup>. Os hidrogéis foram inspecionados visualmente e armazenados a 4°C até o momento do uso.

### **3.18. Caracterização do hidrogel**

#### *3.18.1. Teste de intumescimento*

Para avaliar a capacidade de intumescimento, 20 mL do hidrogel escolhido por conferir maior resistência mecânica ao gel foi produzido, desenformado e cortado (1,5 × 1,5 cm) com auxílio de uma espátula e os cubos de hidrogel obtidos devidamente pesados, sendo esse considerado o peso inicial dos mesmos (Pi). Em seguida, foram colocados em béqueres contendo 10 mL de tampão fosfato salina (PBS) 0,5% (v/v) ou em água tipo I. Os béqueres foram devidamente vedados com filme plástico Parafilm M<sup>®</sup> e armazenados em temperatura ambiente por 72 h. A cada 24 h os hidrogéis eram inspecionados, retirados da solução salina ou água, gentilmente secos e pesados. A cada 24 h o peso final (Pf) e a taxa de intumescimento foi calculada segundo a seguinte equação:

$$\text{Taxa de intumescimento (\%)} = \left( \frac{Pf - Pi}{Pi} \right) \times 100$$

#### *3.18.2. Teste de ressecamento*

Os hidrogéis confeccionados foram desenformados, cortados (1,5 × 1,5 cm) com auxílio de uma espátula e pesados. Os mesmos foram colocados em béqueres abertos e deixados em temperatura ambiente. Seu peso foi averiguado a cada 24 h por até 72 h. Imagens dos hidrogéis foram registradas ao final das 72 h a fim de avaliar qualitativamente a degradação.

### 3.18.3. Teste de fixação

Os hidrogéis produzidos foram colocados sobre pele sintética para tatuagem e sobre plástico polietileno e pressionados por 30 s. Em seguida foram invertidos 180° e deixados nessa posição até que os hidrogéis se desprendessem por completo (100%). O tempo necessário para desprendimento foi medido com o auxílio de um cronômetro.

### 3.18.4. Incorporação dos lipossomas em hidrogel

Hidrogéis foram produzidos a partir volume de 500 µL (sendo 250 µL de água tipo I e 250 µL de lipossomas) na concentração final de 2,5% (m/v) de quitosana e 3% (m/v) de agarose. Os mesmos foram agitados e deixados a 4°C até o momento do uso em testes posteriores.

### 3.18.5. Formação de halo de inibição

Colônias isoladas de *E. coli* e *S. aureus* foram cultivadas em meio LB líquido a uma temperatura de 37°C *overnight* em uma incubadora tipo *shaker* com agitação de 120 rpm. Em seguida, os meios de cultura com as bactérias foram diluídos em meio líquido LB até a densidade óptica (OD<sub>600</sub>) de 0,05 e inoculados, com auxílio de uma alça drigalsky, em placas de Petri contendo meio LB sólido. Os hidrogéis já complexados com lipossomas contendo extratos aquosos e etanólicos/aquosos advindos do material botânico seco foram posicionados sobre o meio LB sólido e inspecionados visualmente por 24, 48 e 72 h. O halo de inibição formado foi mensurado por meio das imagens fotográficas obtidas nos 3 tempos citados acima com auxílio do *software* ImageJ. O halo foi medido em 4 posições distintas equivalente a 0°, 90°, 180° e 270°.

### 3.18.6. Teste de liberação

Hidrogéis produzidos com o volume final de 500 µL contendo lipossomas (LpV e LpC) do extrato escolhido após as triagens foram adicionados juntamente com 1 mL de água tipo I dentro de membrana de diálise com massa molecular de exclusão de 12 - 14 kDa. A membrana de diálise foi clipada e acondicionada dentro de recipiente com 40 mL de água tipo I. A condutividade elétrica do meio externo foi medida nos tempos de 0; 0,25; 0,50; 0,45; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6; 24; 48 e 72 h. O modelo derivado com base na suposição de que durante a liberação do princípio ativo (extrato) e os subsequentes processos de difusão conforme a lei de Fick foram obedecidos determinando a constante de velocidade (k) (Xu, X., Khan, M.A.,

Burgess, D.J. 2012). Conseqüentemente, o teor restante de princípio ativo seguiu um aumento exponencial e, utilizando o balanço de massa, o teor de extrato liberado pode ser calculado conforme mostrado na equação abaixo:

$$Q = 100 \times (1 - e^{-kt})$$

Onde Q é a porcentagem de liberação cumulativa, k é a constante de taxa de liberação e t é o tempo (h) após a adição do hidrogel no meio de diálise.

### **3.19. Análises estatísticas**

No intuito de comparar as médias e a significância estatística entre as características físico-químicas de lipossomas produzidos e teste conduzidos com repetições, análises estatísticas foram realizadas por teste de normalidade em cada tratamento e análise de variância (One-way ANOVA) com um posterior teste para comparação das médias. Teste Tukey (3 ou mais comparações simultâneas) e teste T (comparações entre duas análises) foram empregados, onde as diferenças entre as médias foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ . O *software* PAST 3 (Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001) foi utilizado.

## CAPÍTULO II

### NANOFORMULAÇÕES À BASE DE LIPOSSOMAS FORMADAS COM FOSFOLIPÍDEOS E EXTRATOS DE MATERIAIS BOTÂNICOS *IN NATURA*



**Figura II.1** – Resumo gráfico do Capítulo I no qual foi desenvolvido um método fácil e barato para síntese de lipossomas utilizando plantas medicinais. Etapas iniciais para formulação de lipossomas a partir de fosfolipídeos extraídos diretamente de folhas e pecíolos (após extração de clorofila). A etapa nanoestruturação consistiu em adicionar o próprio extrato aquoso aos fosfolipídeos extraídos da mesma planta. A etapa de caracterização foi importante para confirmar o sucesso nas etapas anteriores.

## Resumo

Lipossomas são vesículas concêntricas que apresentam característica anfipática. Existem várias metodologias que demonstram a produção de lipossomas, mas em geral poucos casos utilizam componentes 100% de fonte vegetal. Dessa forma, esse Capítulo II visa formar lipossomas utilizando compostos extraídos de plantas medicinais para futura incorporação em hidrogel e avaliação de bioatividade para futura aplicação tópica. Para isso, escolheu-se uma metodologia para síntese de lipossomas adaptada a partir da patente WO2016119030A1. A adaptação foi necessária visto que se aplicando a mesma metodologia originalmente empregada para materiais de origem animal, com fontes vegetais, havia também a necessidade de extração da clorofila. Verificou-se que foi possível nanoestruturar em pelo menos 17 das 20 espécies utilizando fosfolipídeos na formação de filmes lipídicos reconstituídos com extrato aquoso do material botânico *in natura*. A microscopia de força atômica (MFA) demonstrou nanoestruturas, corroborando o obtido por espalhamento de luz dinâmico (DLS). A espectroscopia Raman indicou picos e bandas correspondentes à formação lipossomas. As avaliações de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersividade (PdI) e potencial Zeta (pZ) demonstram a viabilidade em produzir lipossomas a partir de fontes 100% vegetais, desde que haja um pré-tratamento para remoção de clorofila, e os resultados mostraram que o uso desses extratos tornou esses nanossistemas, em geral, mais estáveis coloidalmente.

**Palavras-chave:** Fitolipossomas, Raman, extratos vegetais, plantas medicinais.

## Abstract

Liposomes are concentric vesicles that have amphipathic characteristics. There are several methodologies that demonstrate the production of liposomes, but in general few cases use 100% plant-based components. Therefore, this Chapter II aims to form liposomes using compounds extracted from medicinal plants for future incorporation into a hydrogel and evaluation of bioactivity for future topical application. For this, a methodology for liposome synthesis adapted from patent WO2016119030A1 was chosen. The adaptation was necessary since applying the same methodology originally used for materials of animal origin, with plant sources, there was also a need to extract chlorophyll. It was found that it was possible to nanostructure at least 17 of the 20 species using phospholipids in the formation of lipid films reconstituted with an aqueous extract of the natural botanical material. Atomic force microscopy (MFA) demonstrated nanostructures, corroborating that obtained by dynamic light scattering (DLS). Raman spectroscopy indicated peaks and bands corresponding to liposome formation. The evaluations of hydrodynamic diameter (DH), polydispersity index (PdI) and Zeta potential (pZ) demonstrate the feasibility of producing liposomes from 100% vegetable sources, as long as there is a pre-treatment to remove chlorophyll, and the results showed that the use of these extracts made these nanosystems, in general, more colloidally stable.

**Keywords:** Phytoliposomes, Raman, plant extracts, medicinal plants.

## 1. INTRODUÇÃO

Os lipossomas são vesículas de base biológica que geralmente têm diâmetros variando de cerca de 20 a 1000 nm e podem carrear compostos hidrofílicos ou hidrofóbicos (Contri, R.V. et al., 2014). Quando considerados os fosfolipídeos utilizados para a formulação de lipossomas tem-se os sintéticos e os naturais (Batista, C.M., Carvalho, C.M.B., Magalhães, N.S.S., 2007). A obtenção de fosfolipídeos sintéticos é uma técnica onerosa e os extraídos de fontes naturais são, geralmente, de origens animais ou extraídos de óleos vegetais.

Uma das possibilidades ainda negligenciadas para a formulação de lipossomas seria a extração de fosfolipídeos de recursos vegetais (lipossomas vegetais) a partir do material botânico *in natura*. No entanto, não há relatos anteriores na literatura sobre a formulação de lipossomas a partir de outros materiais à base de plantas, extraídos particularmente de mais de 20 amostras de plantas medicinais *in natura*. Assim, a utilização de uma ampla diversidade de materiais botânicos, além de facilitar a obtenção de recursos naturais acessíveis, abundantes e livres de patógenos humanos, também pode trazer benefícios se o encapsulamento for realizado com extratos vegetais de plantas medicinais como agentes preventivos e terapêuticos.

Devido à sua capacidade de simular o comportamento das membranas celulares naturais, os lipossomas têm sido reconhecidos pela indústria farmacêutica como um nanossistema de destaque para veiculação de fármacos para o tratamento de doenças (Nieuwenhuyzen, W.V., Tomas M.C. 2008) e também até mesmo para agricultura (Taylor et al., 2007). Geralmente para essas aplicações são desejáveis lipossomas que carreguem compostos isolados ou combinações bem definidas. No que se refere à possibilidade de formar lipossomas para o transporte de extratos complexos de plantas, eles normalmente são para uso alimentício com vistas a aumentar a vida útil de diferentes alimentos (Muñoz-Shugulí, C. et al., 2021), retardando a deterioração bacteriana e os processos oxidativos (Tomety, S.S. et al., 2020).

Assim, a formulação de lipossomas que apresentem tanto os seus fosfolipídeos como seu conteúdo bioativo extraídos de uma mesma planta medicinal pode trazer benefícios não apenas para área alimentícia, mas também para área farmacêutica, visto que, seria possível formar lipossomas com propriedades biológicas como antimicrobiana, antioxidante, etc. Uma vantagem particular da síntese deste tipo de lipossomas é que eles advêm de fontes 100% naturais e de origem vegetal, podendo, futuramente, serem considerados fitoterápicos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) promulga que “são considerados

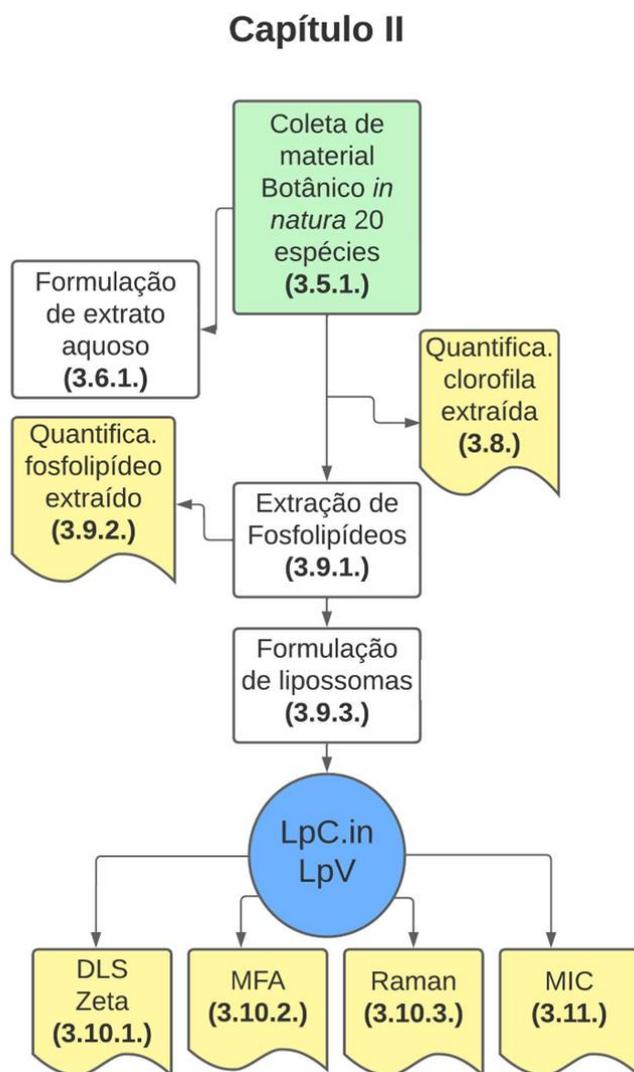
medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais” (Brasil, RDC nº 26, 2014) reduzindo os obstáculos regulatórios que podem impedir a sua aplicação. O uso de plantas medicinais e células vegetais pode diversificar a entrada de matérias-primas para a extração de fosfolipídeos e produção de lipossomas em larga escala e com atributos desejáveis. O propósito deste Capítulo II foi produzir e caracterizar formulações à base de lipossomas extraído os fosfolipídeos e extratos a partir de materiais botânicos *in natura*, a fim de diversificar a entrada de matérias-primas e oferecer soluções mais sustentáveis, propondo um novo método de produção de lipossomas vegetais com possível atividade antimicrobiana.

## 2. OBJETIVOS

- Desenvolver rota para extração, isolamento e quantificação de fosfolipídeos vegetais;
- Produzir formulações lipossomais à base de fosfolipídeos e extratos vegetais;
- Caracterizar os lipossomas por técnicas de espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletroforética;
- Caracterizar os lipossomas por Microscopia de Força Atômica;
- Caracterizar os lipossomas por espectroscopia Raman;
- Testar os lipossomas quanto à possível atividade antibacteriana.

### 3. METODOLOGIA

A metodologia do presente Capítulo II está delineada na Figura II.2, conforme explicitado na apresentação da Tese, sendo que a descrição detalhada dos materiais e métodos se encontra no Capítulo I.

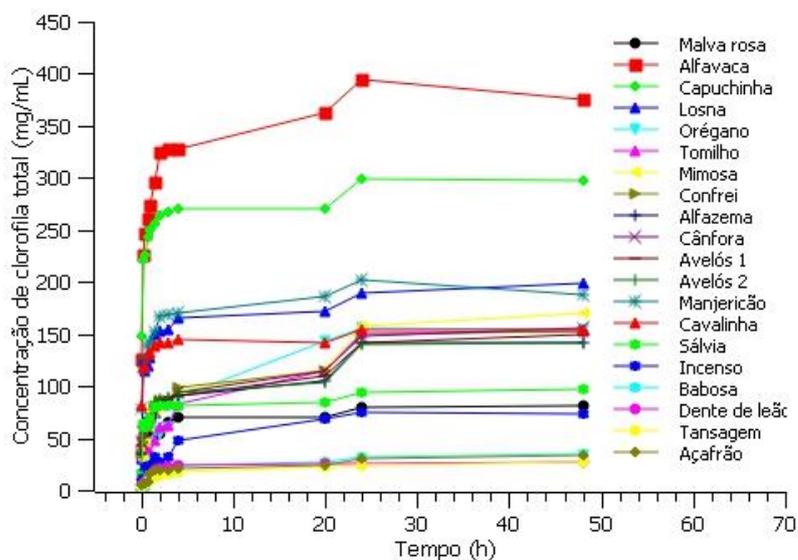


**Figura II.2** – Fluxograma representativo das metodologias utilizadas para obtenção dos resultados apresentados no Capítulo II da presente Tese. Sendo o retângulo em verde a etapa inicial de coleta de material botânico; retângulos brancos, etapas intermediárias; e caixas em coloração amarela, etapas de caracterização. Estrutura redonda azul demonstra quais nanomateriais foram produzidos, sendo LpC.in (lipossoma cheio contendo extrato aquoso obtido a partir de material botânico *in natura*), LpV (lipossoma vazio). As numerações em negrito abaixo de cada item do fluxograma indicam a numeração da seção na qual essa metodologia foi descrita no Capítulo I.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

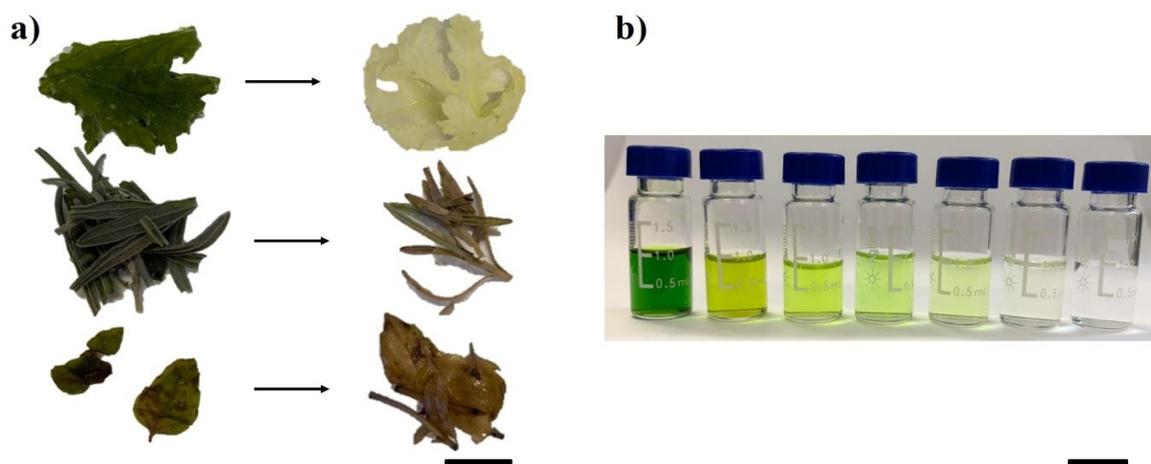
### 4.1. Quantificação da clorofila

A etapa de extração de clorofila foi uma etapa essencial para que a extração de fosfolipídeos acontecesse, visto que a clorofila poderia ser extraída no mesmo solvente utilizado para extração dos fosfolipídeos, o clorofórmio. A partir dessa etapa foi possível averiguar que concentrações variadas de clorofila foram extraídas, conforme demonstrado na Figura II.3. Essas diferentes concentrações de clorofila extraídas já são reconhecidas pela literatura entre diferentes espécies, e até mesmo dentro da mesma espécie, dependendo de questões relacionadas à sazonalidade, estágio de desenvolvimento, idade e de fatores abióticos e bióticos aos quais a planta é exposta (Fernández-León, M.F. et al., 2010; Heng-Moss, T.M. et al., 2003). Para que não houvesse a saturação da solução extratora (acetona), após 20 h houve a troca da mesma. Percebeu-se um leve aumento na concentração extraída em 24 h, pois os valores obtidos anteriormente foram somados aos obtidos após essa troca. Pode-se perceber que a partir de 24 h de experimento não há mais variação da concentração total de clorofila extraída, indicando que houve a extração completa do pigmento. Essa etapa do uso da acetona para remover a clorofila não afeta a composição e abundância dos fosfolipídeos presentes, pois existem estudos que mostram que misturas de fosfolipídeos são praticamente insolúveis em acetona e também não ocorrem modificações químicas expressivas (Joshi, A., Paratkar, S.G., Thorat, B.N., 2006). Além disso, para minimizar o risco de oxidação, as amostras foram mantidas a 4°C no escuro durante todo o processo.



**Figura II.3** – Curvas cinéticas da concentração total de clorofila extraída e liberada durante o intervalo de tempo avaliado. Processos de extração da clorofila total das 20 espécies avaliadas utilizando cálculo realizado a partir de leituras espectrofotométricas nos comprimentos de onda de 633 e 645 nm.

Como se pode observar na Figura II.4a, as folhas de algumas das espécies avaliadas após a etapa de extração da clorofila apresentaram cor acastanhada, possivelmente devido à maior concentração de polifenol oxidase, que promove o escurecimento enzimático das folhas (Martinez. M.V., Whitaker, J.R. 1995). Já foi verificada uma maior concentração de polifenol oxidase em alfazema (Grebennikova, O. Et al., 2017), indicando assim uma possível razão de seu escurecimento acentuado. Na Figura II.4b são observadas as diferentes colorações de 7 soluções extrativas após 20 h.



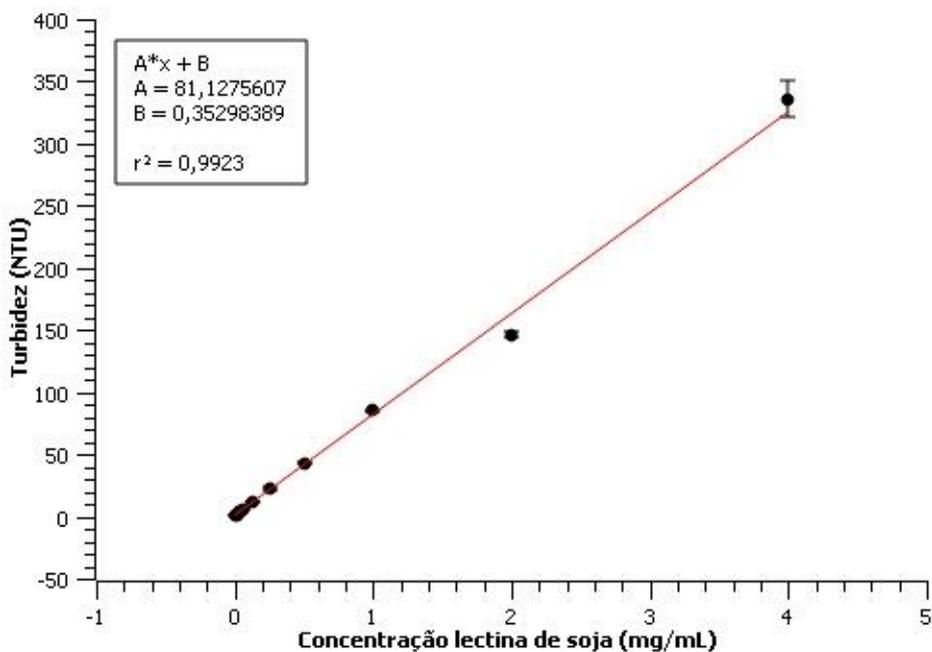
**Figura II.4** – Imagens representativas da etapa de extração da clorofila presente nos materiais botânicos. a) Fotografias das folhas de três espécies diferentes, antes (esquerda) e após (direita) a etapa de extração da clorofila, sendo de cima para baixo as espécies capuchinha, alfazema e manjerição roxo; b) Clorofila

extraída de diferentes espécies vegetais, sendo da esquerda para direita a extração das espécies: alfavaca, capuchinha, losna, orégano, tomilho, malva rosa e água como controle negativo. A barra preta representa 1 cm.

Verifica-se assim que a etapa de extração de clorofila aconteceu com êxito, sendo assim foi possível avançar o estudo para próximas etapas de extração de fosfolipídeos.

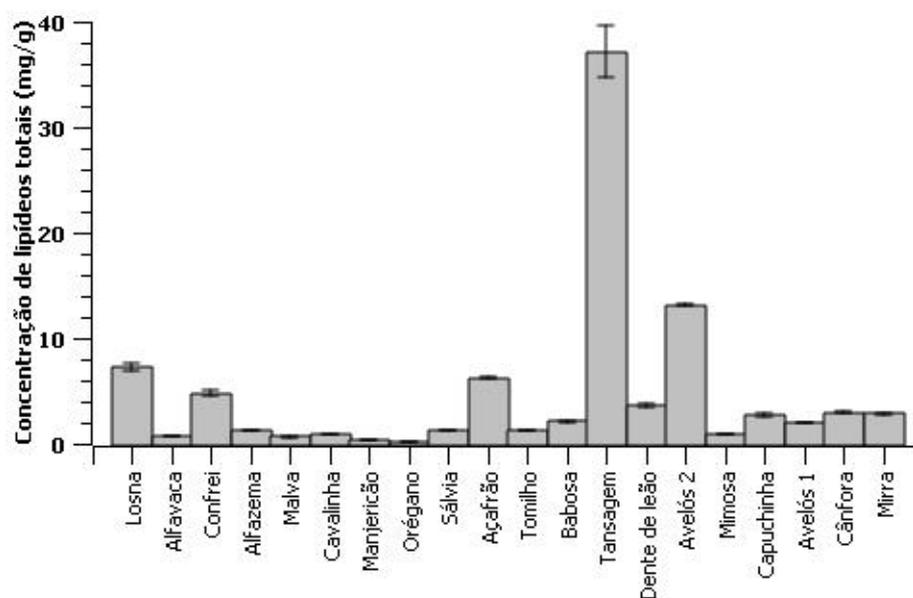
## 4.2. Quantificação de fosfolipídeos

Para a quantificação de fosfolipídeos extraídos dos materiais vegetais foi necessário primeiramente realizar uma diluição seriada de lecitina de soja em acetona, sendo realizadas três leituras de cada diluição e com os valores obtidos foi elaborada a seguinte curva padrão (Figura II.5).



**Figura II.5** – Curva padrão da correlação entre a concentração de lectina de soja (mg/mL) e turbidez (NTU). A equação da reta e o  $r^2$  são apresentados.

As leituras de turbidez das amostras foram correlacionadas com a equação da reta apresentada anteriormente e foi possível obter a concentração de lipídeos totais extraídos de cada amostra e seu desvio padrão conforme mostrado na Figura II.6. Dentre os resultados obtidos, tansagem >>> avelós 2 > losna = açafão > confrei foram as espécies que apresentaram maiores concentrações determinadas de lipídeos totais.



**Figura II.6** – Quantificação dos lipídeos totais extraídos em miligramas por grama de material botânico *in natura*.

Lipídeos desempenham papéis importantes para as células vegetais no armazenamento de energia, estruturação da membrana celular e vias de sinalização (Tran, T.M. et al., 2019). As variações no conteúdo total de lipídeos extraídos podem estar correlacionadas ao genótipo dessas espécies e também aos fatores abióticos às quais elas foram expostas (Cequier-Sánchez, E. et al., 2008). Um estudo de décadas atrás demonstrou que a composição lipídica, principalmente de fosfolipídeos, da Tansagem (*Plantago major*), está intimamente interligada a condições nutricionais oferecidas para a planta. O baixo teor de sais minerais na terra de plantio reduziu o nível de galactolipídeos nas raízes das plantas (Kuiper, D. Kuiper, P.J. 1978). Em outros estudos a quantificação de lipídeos extraídos normalmente ocorre nas sementes (Alkhalaf, M.I. et al., 2019; Grygier, A. 2023), visto que essa parte armazena maior quantidade de lipídeos do que as folhas (Reszczyńska, E. Hanaka, A. 2020). Sendo assim, há uma lacuna na literatura em estudos com quantificação de lipídeos em folhas, principalmente quando se faz comparação entre mais de uma espécie.

Quando se trata de classe lipídica de membrana predominante nas plantas, as principais classes são esfingolipídeos, fosfoglicerolipídeos, galactolipídeos e lipídeos esteróis. Os esfingolipídeos (glicosilceramidas e glicosilinositolfosfoceramidas) estão presentes em membranas extraplastidiais de plantas. Os fosfoglicerolipídeos (fosfatidilcolina e

fosfatidiletanolamina) são constituintes abundantes da membrana plasmática, do tonoplasto e do retículo endoplasmático (Weaver et al., 2011). Os galactolipídeos são, normalmente, restritos às membranas dos plastídios, entretanto quando há deficiência de fosfato na planta os galactolipídeos também podem se acumular nas membranas extraplastídias (Weaver, V., Dormann, P., Holzl, G., 2013). Por fim, os lipídeos esteróis representam a terceira classe de lipídeos mais abundante de membrana plasmática em plantas.

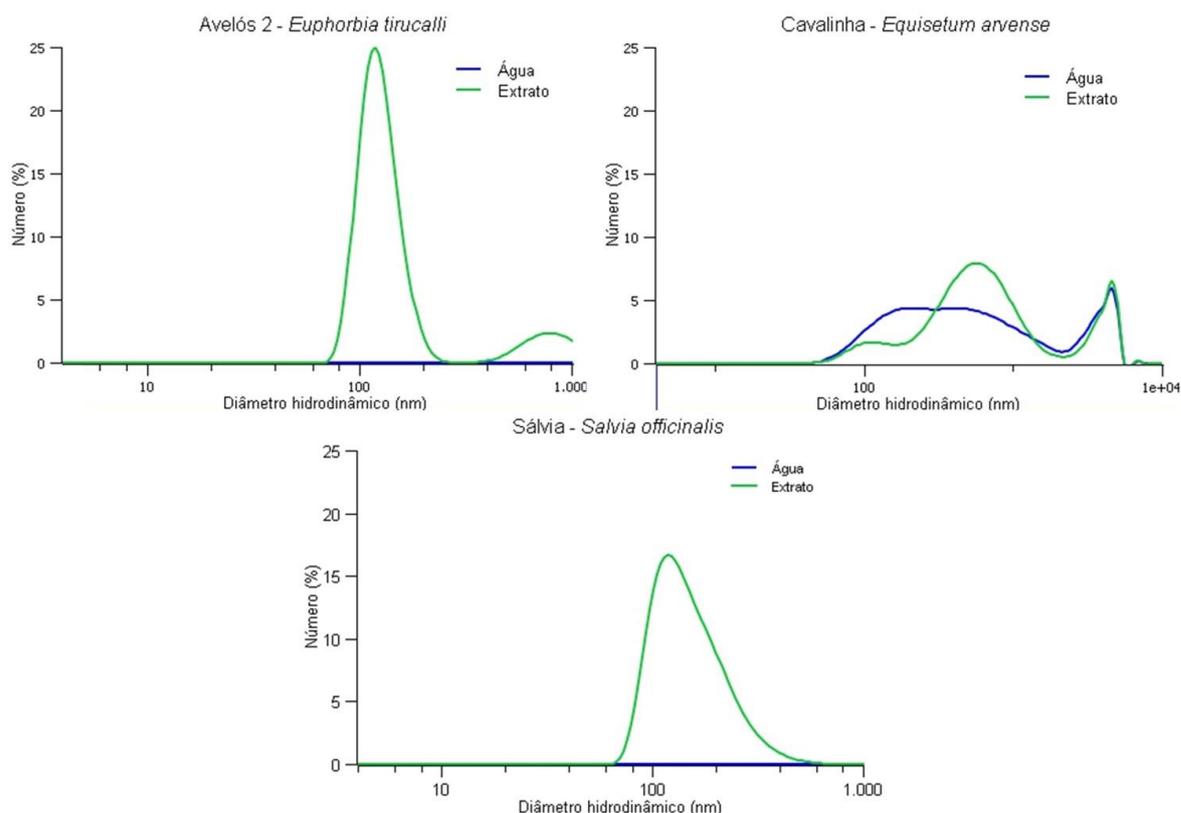
Esses lipídeos podem ter uma variação grande de sua concentração dependendo da espécie, do estágio de desenvolvimento da planta, condições de luz, tipo de tecido e até mesmo se a planta está sofrendo algum estresse ou deficiência de nutriente (Dyas, L., Goad, L., 1993). Então, a variação encontrada no presente estudo é considerada normal visto que espécies diferentes foram utilizadas com até mesmo locais de plantios distintos. Verificado que foi possível extrair lipídeos a partir da metodologia utilizada, a etapa seguinte envolveu a avaliação da possibilidade de utilizar esses lipídeos nanometricamente estruturados em lipossomas.

#### **4.3. Análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta (pZ)**

Após a etapa de extração de fosfolipídeos dos materiais biológicos de cada espécie houve a produção espontânea dos lipossomas a partir da hidratação dos filmes lipídicos em água (LpV) ou extratos aquosos (LpC.in) na concentração de 100 mg/mL.

Amostras dos lipossomas produzidos foram diluídas 10× em água tipo I e avaliadas por DLS. Como pode ser observado na Figura II.7, somente as amostras produzidas com as espécies avelós 2 (*E. tinucalli*) e sálvia (*S. officinalis*) não indicaram a formação de lipossomas quando o conteúdo do mesmo era água, sendo que a tentativa de caracterização por DLS resultou em abortamento da leitura, indicando que não haviam estruturas mensuráveis para essas formulações. Na análise de quantificação de lipídeos, tanto avelós 2 quanto a sálvia indicaram extração de lipídeos totais. Observa-se que avelós 2 apresentou a segunda maior concentração de lipídeos extraídos. Portanto, pode-se inferir que a ausência de nanoestruturação não ocorreu devido à falta de lipídeos. Neste caso, a água possivelmente não ofereceu uma pressão osmótica favorável para a nanoestruturação, sendo possível apenas com o extrato de cada espécie. Além disso, analisando os lipossomas produzidos com a espécie cavalinha (*E. arvense*) foi demonstrada alta polidispersividade, ou seja, com subpopulações muito distintas, indicando inclusive que não haviam estruturas nanométricas (abaixo de 100 nm), na amostra analisada. Isso pode indicar que os fosfolipídeos extraídos desta espécie não ofereceram os componentes

necessários ou foram inadequados para produzir nanossistemas lipossomais estáveis e monodispersos (Li, Y., Wang, X., Ernst, R.K., 2011).



**Figura II.7** – Curvas de distribuição do tamanho (diâmetro hidrodinâmico) em número (%) de tentativas não bem sucedidas de formação de lipossomas com fosfolípídeos extraídos a partir de materiais biológicos de 3 diferentes espécies vegetais. Os lipossomas veiculam apenas água tipo I (linha azul) ou extrato aquoso das folhas da própria espécie utilizada para obter os fosfolípídeos (linha verde).

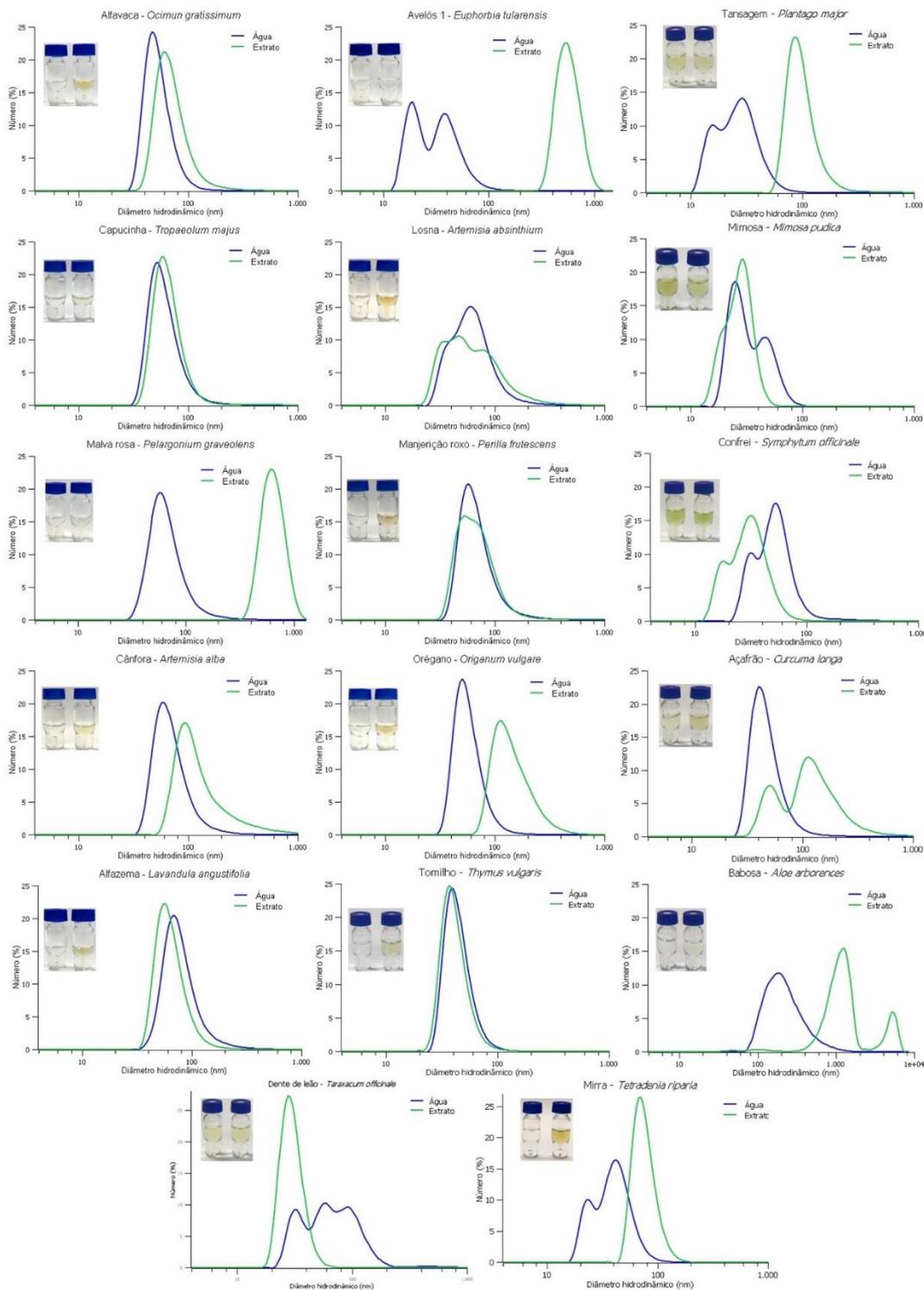
Por outro lado, 17 das 20 espécies avaliadas quanto à extração de fosfolípídeos possibilitaram a nanoestruturação de lipossomas, conforme demonstrado na Figura II.8, sendo que a maioria delas resultaram em suspensões com uma única população de nanoestruturas. Todas as nanoformulações lipossomais contendo água em seu interior (LpV) apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio menor que 100 nm; 7 das 17 nanoformulações produzidas não apresentaram alteração expressiva nas distribuições de diâmetros hidrodinâmicos quando o conteúdo variou de água (LpV) para extrato (LpC.in), 8 aumentaram seu DH quando estavam cheias (LpC.in) e apenas 2 diminuíram. Estudos anteriores demonstraram que quando lipossomas carregavam extrato não havia alteração significativa dos seus tamanhos (Gortzi, O. et al., 2008; Ai, Y. et al., 2022). Avaliando a formação de lipossomas, é importante ressaltar que as estruturas se tornaram nanométricas em tamanho, mesmo sem que fossem submetidas a

algum processo específico de homogeneização das vesículas, como a microextrusão por membrana. O processo de microextrusão por membrana é oneroso, e isso torna a extração de fosfolípidos de fontes vegetais *in natura* para a produção de lipossomas na abordagem apresentada ainda mais atraente do ponto de vista econômico. De fato, a extração de fosfolípidos a partir de fontes vegetais poderá ser um processo mais acessível e prático do que aquele comumente empregado, principalmente, pela indústria farmacêutica. Quando se trata de uma produção em escala maior, a etapa de extrusão por membrana também pode ser uma dificuldade, sendo necessária, por exemplo, a homogeneização de alta pressão (Laouini, A. et al., 2013; Sorgi, F.L., Huang, L. 1996).

Na Figura II.8 também é possível observar as imagens dos tubos que demonstram LpV (à esquerda) e LpC.in (à direita), com a maioria delas contrastando quanto à coloração apresentada pelas formulações vazia (comumente mais clara) e cheia (comumente com cor mais pronunciada em função da presença de extrato vegetal. Em alguns casos ainda foi possível notar uma leve coloração esverdeada possivelmente em função de resíduos de clorofila que podem ter permanecido.

Avaliando outras características físico-químicas das suspensões, na Tabela II.1 pode-se observar que o PDI aumentou de forma estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em apenas 4 das 17 formulações quando os lipossomas continham extrato (LpC.in) quando comparados aos lipossomas contendo apenas água (LpV). Este resultado foi possivelmente obtido, pois, quando os fosfolípidos formam espontaneamente uma vesícula e encapsulam o conteúdo de extratos (metabólitos), acabam se estruturando em tamanhos variados. Isso resultou em uma maior heterogeneidade nesses lipossomas produzidos que contêm extrato do que naqueles que contêm apenas água e, conseqüentemente, em um PDI maior (Mohan, A. et al., 2018). Contudo, destaca-se que tal comportamento não foi observado na maior parte dos lipossomas formados.

Ao avaliar o pZ das suspensões lipossomais, também é possível notar que 5 das 17 formulações apresentaram pZ maior em módulo de forma estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ), quando os lipossomas continham extrato vegetal. Esse resultado corrobora com a literatura, já que os metabólitos presentes no extrato podem estar também recobrando os lipossomas, causando alteração no pZ e conferindo maior estabilidade coloidal das nanoestruturas na suspensão (Altin, G., Gültekin-Özgüven, M., Ozcelik, B., 2018). Contudo, cabe destacar que para a grande maioria dos lipossomas formados não houve diferença significativa no pZ dos LpC.in quando comparados aos correspondentes LpV.



**Figura II.8** – Curvas de distribuição do tamanho (diâmetro hidrodinâmico) em número de lipossomas produzidos com fosfolípidos extraídos a partir de materiais biológicos de 17 diferentes espécies vegetais, que apresentaram nanoestruturação em lipossomas vazios e contendo extrato. Os lipossomas podem veicular água tipo I (linha azul) ou extrato aquoso das folhas da própria espécie utilizada para obter os fosfolípidos (linha verde), no lado esquerdo de cada gráfico, há uma imagem com dois tubos de tampa azul, sendo que o da esquerda contém lipossomas oriundos de filmes lipídicos ressuspenso em água e o da direita contém lipossomas que veiculam extrato.

**Tabela II.1** – Avaliação da média aritmética e do desvio padrão obtidos a partir de três leituras realizadas no modo automático para o índice de polidispersividade (PdI) e três leituras no modo manual 20 aquisições para o potencial Zeta (pZ).

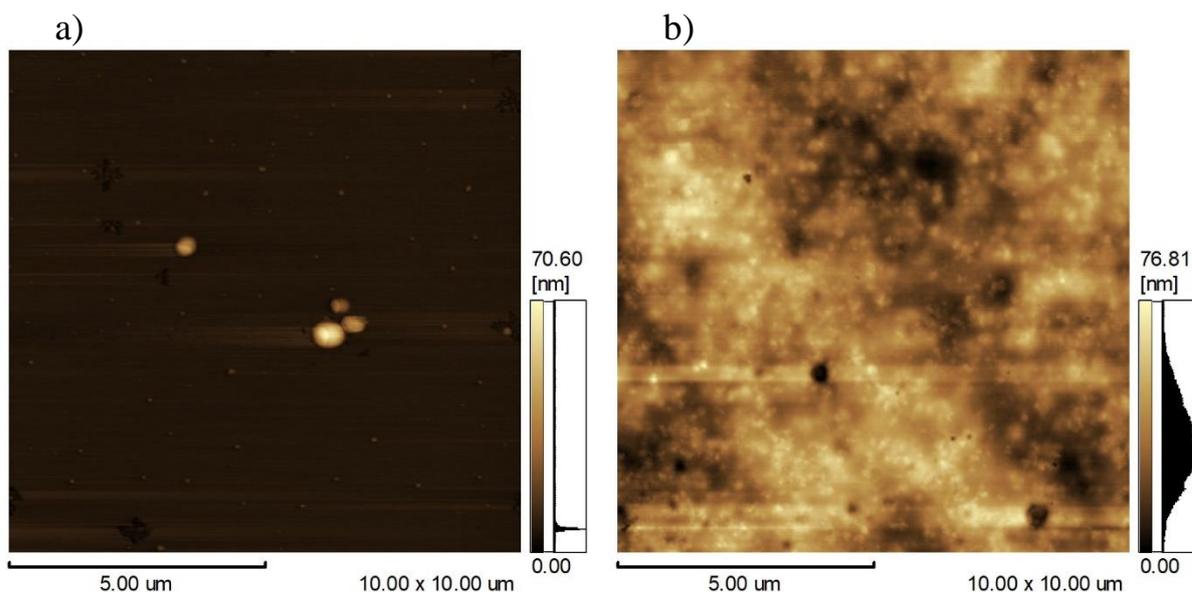
Característica	Lipossomas	Alfavaca – <i>Ocimum gratificimum</i>	Avelós 1 – <i>Euphorbia tularesis</i>	Cânfora – <i>Artemisia alba</i>
PdI	LpV	0,320 ± 0,034	0,284 ± 0,037	0,541 ± 0,144
	LpC.in	0,530 ± 0,074	0,749 ± 0,052 *	0,509 ± 0,126
pZ (mV)	LpV	-17,5 ± 0,9	-8,3 ± 2,9	-1,4 ± 0,7
	LpC.in	-11,0 ± 0,4*	-9,4 ± 0,5	-30,6 ± 1,5*
Característica	Lipossomas	Capuchinha – <i>Tropaeolum majus</i>	Losna – <i>Artemisia absinthium</i>	Orégano – <i>Origanum vulgare</i>
PdI	LpV	0,353 ± 0,116	0,329 ± 0,040	0,360 ± 0,047
	LpC.in	0,738 ± 0,093*	0,282 ± 0,010	0,365 ± 0,010
pZ (mV)	LpV	-5,1 ± 1,1	-17,1 ± 2,1	-13,0 ± 1,5
	LpC.in	-20,8 ± 1,6 *	-19,3 ± 1,1	-29,7 ± 1,4*
Característica	Lipossomas	Malva rosa – <i>Pelargonium graveolens</i>	Manjerição roxo – <i>Perilla frutescens</i>	Alfazema – <i>Lavandula angustifolia</i>
PdI	LpV	0,324 ± 0,022	0,281 ± 0,017	0,400 ± 0,008
	LpC.in	0,908 ± 0,021 *	0,504 ± 0,075	0,523 ± 0,107
pZ (mV)	LpV	-13,6 ± 1,7	-8,2 ± 1,2	-26,6 ± 1,2
	LpC.in	-16,0 ± 0,6	-11,8 ± 2,7	-23,5 ± 1,0
Característica	Lipossomas	Tansagem – <i>Plantago major</i>	Mimosa – <i>Mimosa pudica</i>	Confrei – <i>Symphytum officinale</i>
PdI	LpV	0,350 ± 0,045	1,000 ± 0,000	0,591 ± 0,124
	LpC.in	0,461 ± 0,099	0,960 ± 0,046	0,599 ± 0,070
pZ (mV)	LpV	-25,1 ± 0,3	-31,2 ± 3,9	-27,9 ± 0,9
	LpC.in	-24,3 ± 0,950	-27,0 ± 3,33	-46,1 ± 2,7 *
Característica	Lipossomas	Açafrão – <i>Curcuma longa</i>	Tomilho – <i>Thymus vulgaris</i>	Babosa – <i>Aloe arborescens</i>
PdI	LpV	0,401 ± 0,046	0,524 ± 0,104	0,552 ± 0,061
	LpC.in	0,402 ± 0,021	0,763 ± 0,063 *	0,670 ± 0,150
pZ (mV)	LpV	-25,0 ± 1,6	-29,7 ± 0,6	-23,1 ± 4,6
	LpC.in	-36,8 ± 1,4 *	-22,2 ± 2,8 *	-12,4 ± 0,4 *
Característica	Lipossomas	Dente-de-leão - <i>Taraxacum officinale</i>	Mirra – <i>Tetradenia riparia</i>	
PdI	LpV	0,664 ± 0,111	0,512 ± 0,039	
	LpC.in	0,819 ± 0,165	0,481 ± 0,179	
pZ (mV)	LpV	-50,1 ± 2,2	-43,0 ± 4,2	
	LpC.in	-27,0 ± 0,8 *	-15,8 ± 0,5 *	

Análise estatística *One-way* ANOVA com comparações de Tukey em pares ( $p < 0,05$ ), o \* indica que o valor é estatisticamente diferente quando se compara lipossomas contendo água e extrato da mesma espécie e da mesma característica.

Com base nos dados físico-químicos obtidos, pode-se perceber que em pelo menos 17 das 20 espécies vegetais utilizadas nessa etapa possibilitaram a nanoestruturação de LpV e LpC.in, mesmo sem a utilização de tampões e sem a utilização de processos baseados em extrusão por membrana, etapa comumente utilizada na produção desse tipo de nanossistema. Estes resultados tornam esta metodologia mais atraente, prática e menos onerosa que as demais utilizadas para mesma finalidade.

#### **4.5. Microscopia de força atômica (MFA)**

A MFA é uma técnica que permite explorar diretamente as propriedades em nanoescala de muitos materiais, inclusive de lipossomas (Liang, X. Mao, G. Simon Ng, K.Y., 2004), permitindo a visualização da topografia das estruturas lipossomais mais próxima de intactas possível. A fim de verificar se as nanoestruturas obtidas teriam formações compatíveis com lipossomas, os LpV e LpC.in produzidos utilizando moléculas extraídas de materiais biológicos da espécie *L. angustifolia* (alfazema) foram avaliados por MFA em modo dinâmico e foi possível observar a presença de vesículas esféricas quando avaliado o LpV, reforçando que houve a formação de lipossomas, como demonstra a Figura II.9a. Já quando avaliadas as imagens obtidas quando o filme lipídico foi ressuscitado em extrato vegetal para formação de lipossomas (Figura II.9b), não foi possível obter a visualização de estruturas bem definidas, possivelmente devido à abundância de moléculas presentes no extrato que poderiam instabilizar as estruturas durante a etapa de secagem para as análises ou mesmo permanecer circundando os lipossomas e dificultando as análises por MFA. Esse fato é ainda mais notório tendo em vista que as análises em suspensão destes lipossomas por DLS confirmaram a presença de nanoestruturas.



**Figura II.9** – Imagens obtidas por microscopia de força atômica de lipossomas produzidos com moléculas extraídas de material vegetal da espécie *L. angustifolia* (alfazema). As imagens topográficas de altura apresentadas foram adquiridas no modo dinâmico (fase). a) Lipossomas ressuspensos em água em imagem  $10 \times 10 \mu\text{m}$  b) Lipossomas ressuspensos em extrato de *L. angustifolia* (alfazema) em imagem  $10 \times 10 \mu\text{m}$ .

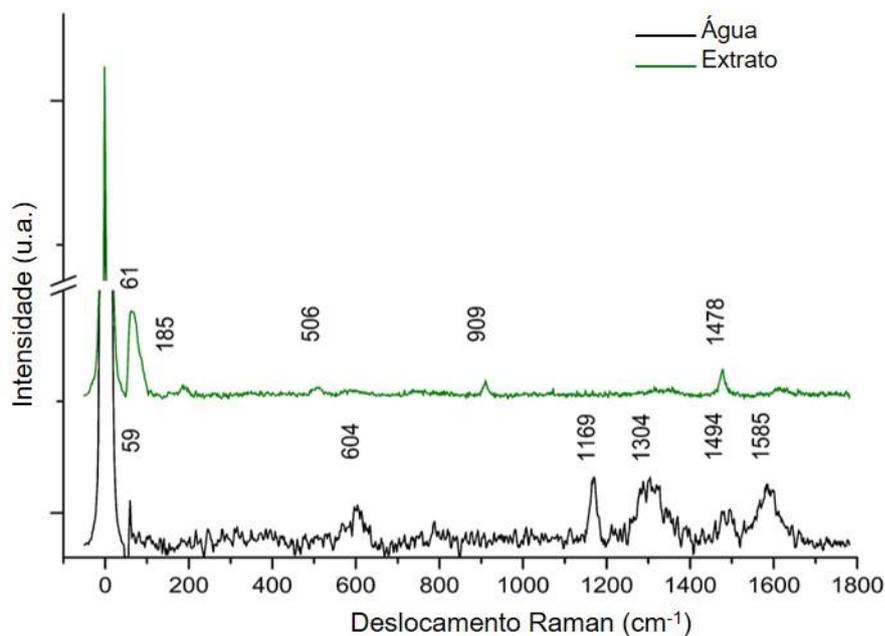
#### 4.6. Espectroscopia Raman

A fim mais uma vez de confirmar a formação lipossomal, os espectros Raman de lipossomas produzidos utilizando moléculas extraídas do material botânico de malva rosa (*P. graveolens*) são mostrados na Figura II.10. Os espectros destacam a presença de diferentes picos/bandas correspondentes a grupamentos funcionais presentes nos lipossomas formados a partir de filmes lipídicos reconstituídos apenas com água ou fito-extrato aquoso de malva rosa. Os resultados mostram que os sinais correspondentes a grupamentos químicos de moléculas do fito-extrato suprimiram aqueles associados aos fosfolipídeos, corroborando a imagem de MFA obtida no tópico anterior (Figura II.9b) em que só foi possível visualizar a presença de uma camada formada por algum material vegetal sem forma definida.

Ao avaliar os picos/bandas detectados no espectro Raman dos lipossomas produzidos com o extrato aquoso de malva rosa, chama a atenção a presença de um pico de baixa intensidade centrado em  $185 \text{ cm}^{-1}$  que pode ser atribuído à torção de CH, t(CH) (Façanha Filho, P.F. et al., 2008). A ligação C—H é, sem dúvida, uma das mais comuns em compostos orgânicos, como os comumente encontrados em metabólitos secundários presentes em extratos aquosos de plantas. Um pico de intensidade baixa centrado em  $506 \text{ cm}^{-1}$  é provavelmente devido às frequências de equilíbrio dos grupos carboxílicos O—C—O (Pawlukojć, A. et al., 2005) que podem estar presentes nas moléculas de extratos vegetais. A literatura já confirmou

a presença de alguns metabólitos secundários no extrato aquoso de *P. graveolens*, tais como: kaempferol 3,7-di-O-glu, isorhamnetin aglicona, quercetina 3-O-glu, quercetina 3-O-pent e kaempferol 3-O-rha-glu (Boukhris, M. et al., 2013). O pico em  $909\text{ cm}^{-1}$  é relatado por alguns autores como possivelmente relacionado ao ácido esteárico, presente em óleos e gorduras animais e vegetais, mais especificamente referindo-se à ligação C—C (ligada à carboxila) (Altunbek, M., Kelestemur, S., Culha, M., 2015; Hu, Z.S., Hsu, S.M., Em Wang, P., 1992). No entanto, a presença de ácido esteárico, um ácido graxo, em lipossomas contendo extratos aquosos é improvável e este estando presente em fosfolipídeos, possivelmente não teria esse sinal vibracional. Assim, parece razoável que o pico centrado em  $909\text{ cm}^{-1}$  possa estar relacionado a alguma deformação angular fora do plano C—H de algum composto orgânico não identificado, talvez alcenos (Gelder, J.D. et al., 2007). Finalmente, o pico proporcionalmente mais intenso em  $1478\text{ cm}^{-1}$  já foi relatado na literatura como um sinal Raman característico de lipídeos diterpênicos presentes em alguns extratos vegetais (Rubayiza, A.B., Meurens, M. 2005; Figueiredo, L.P. et al., 2019).

Ao avaliar os picos atribuídos no espectro Raman de lipossomas formados a partir de filmes lipídicos ressuspensos apenas em água, o pico agudo centrado em  $1169\text{ cm}^{-1}$  pode ser devido às vibrações de curvatura C—H no plano (Liu, X. et al., 2008). Além disso, o pico em  $1304\text{ cm}^{-1}$  já foi relatado em algumas análises espectrais Raman de regiões ricas em lipídeos e pode ser atribuído ao modo de torção de fase  $\text{CH}_2$  (Kaliaperumal, V., Hamaguchi, H. 2012; Takai, Y., Masuko, T., Takeuchi, H., 1997). No entanto, o achado mais interessante foi provavelmente a presença de um pico em  $1494\text{ cm}^{-1}$  que ocorre em micelas e lipossomas à base de surfactantes (Pevzner, E., Ehrenberg, B., Loew, L.M., 1993). Este sinal normalmente não muda, mesmo que o conteúdo veiculado nas nanoestruturas seja variado, uma vez que se refere a vibrações localizadas dentro da porção hidrofóbica das bicamadas lipídicas. Por fim, o pico em  $1585\text{ cm}^{-1}$  também reforça a formação de vesículas à base de fosfolipídeos, uma vez que se refere ao alongamento olefínico de lipídeos  $\text{C}=\text{C}$  (Shen, A. et al., 2005).



**Figura II.10** – Espectros Raman obtidos a partir da suspensão de lipossomas aplicados em placa de aço inoxidável, com lipossomas veiculando água (LpV; linha preta) e lipossomas veiculando extrato aquoso de *P. graveolens* (LpC.in; linha verde) e seus respectivos picos e bandas assinalados.

#### 4.7. Ensaio de atividade antibacteriana

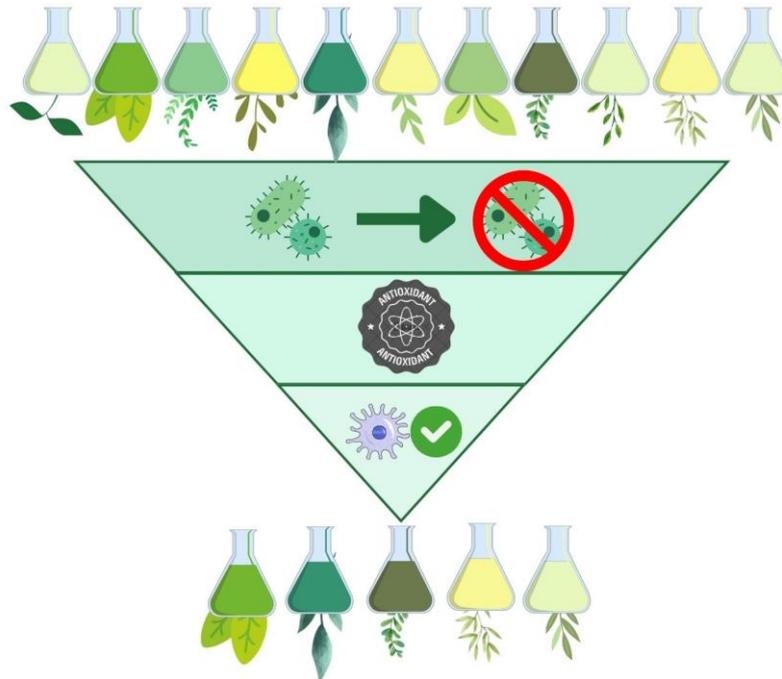
Após 24 e 48 h de monitoramento avaliou-se por inspeção visual o crescimento de bactérias nos poços de microplacas e percebeu-se que houve crescimento de bactérias (*E. coli* e *S. aureus*) em todos os poços nas concentrações de lipossomas e extratos livres investigadas, exceto naqueles poços que continham os antibióticos (controle positivo). Avaliando pela literatura percebeu-se que as concentrações utilizadas dos extratos foram bastante inferiores às utilizadas em ensaios de atividade antibacteriana (Bussmann, R.W. et al., 2010). A concentração utilizada por aqueles autores para apresentar atividade contra *S. aureus* de orégano (*Origanum vulgare*) foi de 128 mg/mL e neste ensaio de atividade antibacteriana utilizado teve como concentração máxima de 0,256 mg/mL, diferença de muitas ordens de grandeza (500×). Por esse motivo, novos testes com concentrações aumentadas foram conduzidos posteriormente (Capítulo III).

## 5. CONCLUSÕES PARCIAIS

Conseguiu-se obter nanoformulações de lipossomas 100% de origem vegetal com diversas espécies de plantas medicinais *in natura*, sendo esse fato por si inédito na literatura, em específico quando se veicula extrato aquoso da própria espécie. Essa metodologia desenvolvida pode se tornar uma vertente muito requerida no futuro para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas que não utilizam produtos de origem animal. Já que se sabe que lipossomas conferem liberação sustentada de princípios ativos, e por estarem futuramente impregnados nesta Tese em uma estrutura tridimensional como o hidrogel, espera-se melhorar ainda mais a sua estabilidade. A metodologia empregada foi distinta em relação àquela utilizada com fosfolídeos de origem animal, com a inclusão de uma etapa adicional quando se utiliza os materiais vegetais, mas não foi necessária a etapa de extrusão por membrana ou outras técnicas de homogeneização, etapas que tornam, em geral, onerosa a fabricação de lipossomas. Os lipossomas vegetais apresentaram DH de  $33,55 \pm 18,08$  nm a  $651,7 \pm 29,97$  nm, sendo a maioria deles apresentou uma única população de nanoestruturas. Para confirmar a presença de vesículas foi realizada avaliação por MFA que confirmou a presença de nanoestruturas quando ressuspenso em água, mas com desafios técnicos ainda para avaliar os lipossomas veiculando extrato vegetal. Já com a avaliação por espectroscopia Raman foi possível confirmar que essas nanoestruturas apresentaram alguns picos e bandas correspondentes aos esperados para lipossomas. Contudo, nos ensaios de concentração inibitória mínima ficou evidente que as concentrações de extrato utilizadas foram muito baixas em comparação com outros ensaios já descritos na literatura com algumas dessas espécies e que mostraram atividade antibacteriana, necessitando assim de concentrações mais altas e realização de novos ensaios. De todo modo, conseguiu-se desenvolver lipossomas a partir de recursos vegetais, mas com base nos resultados obtidos até o momento ainda mostraram necessidade de otimização das formulações.

### CAPÍTULO III

#### EXTRATOS DE PLANTAS E LIPOSSOMAS COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E NÃO CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS



**Figura III.1** – Resumo gráfico do Capítulo III, sendo que a partir de 11 materiais botânicos secos realizou-se uma triagem de quais apresentam atividade antibacteriana, capacidade antioxidante e que não tenham citotoxicidade sobre células eucarióticas.

## Resumo

Os extratos de plantas, uma rica fonte de metabólitos secundários, têm sido parte integrante da medicina tradicional, muitas vezes exibindo propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Aproveitando esses atributos, a indústria farmacêutica pode incorporar esses compostos naturais em nanoformulações. Dada a suscetibilidade da pele a patógenos, a busca por extratos de plantas que revelem potencial antimicrobiano e antioxidante, preservando a integridade das células epiteliais, e assim possa ser nanoestruturado assume grande importância. Este capítulo se concentrou na triagem de extratos vegetais aquosos e etanólicos/aquosos de custo baixo que podem ser veiculados em lipossomas. Dos 11 extratos aquosos, 11 etanólicos/aquosos e 11 lipossomas contendo extrato etanólicos/aquosos avaliados, pelo menos 4 (2 nanoformulações e 2 extratos) exibiram atividade bactericida contra *S. aureus*, potente atividade antioxidante e não alteraram a viabilidade celular eucariótica. Extratos de alfazema (*Lavandula officinalis*) e orégano (*Origanum vulgare*) surgiram como candidatos em potencial para aplicações tópicas. Outros extratos e lipossomas também revelaram efeitos específicos antimicrobianos ou em células eucarióticas, sugerindo aplicações futuras. Essas descobertas impulsionam a busca por agentes bioativos, oferecendo benefícios antimicrobianos sem comprometer a viabilidade das células eucarióticas.

**Palavras-chave:** Bioativos; Fitoquímicos; Antioxidante; Extrato vegetal; Viabilidade celular.

## Abstract

Plant extracts, a rich source of secondary metabolites, have been an integral part of traditional medicine, often exhibiting antimicrobial and antioxidant properties. Taking advantage of these attributes, the pharmaceutical industry can incorporate these natural compounds into nanoformulations. Given the skin's susceptibility to pathogens, the search for plant extracts that reveal antimicrobial and antioxidant potential, preserving the integrity of epithelial cells, and that can be nanostructured is of great importance. This chapter focused on screening low-cost aqueous and ethanolic/aqueous plant extracts that can be delivered in liposomes. Of the 11 aqueous, 11 ethanolic/aqueous extracts and 11 liposomes containing ethanolic/aqueous extract evaluated, at least 4 (2 nanoformulations and 2 extracts) exhibited bactericidal activity against *S. aureus*, potent antioxidant activity and did not alter eukaryotic cell viability. Extracts of lavender (*Lavandula officinalis*) and oregano (*Origanum vulgare*) have emerged as potential candidates for topical applications. Other extracts and liposomes have also revealed specific antimicrobial or eukaryotic cell effects, suggesting future applications. These discoveries drive the search for bioactive agents offering antimicrobial benefits without compromising the viability of eukaryotic cells.

**Keywords:** Bioactives; Phytochemicals; Antioxidant; Plant extract; Cell viability.

## 1. INTRODUÇÃO

Numerosos extratos de plantas exibem atividades antimicrobianas e antioxidantes. De fato, extratos obtidos por extração com solventes orgânicos são amplamente testados e estudados para essas atividades; no entanto, a maioria deles não seguem os princípios da química verde. Por outro lado, extratos aquosos e etanólicos de plantas específicas têm sido reconhecidos por suas atividades antioxidantes e até antimicrobianas, ao mesmo tempo em que estes solventes são perfeitamente alinhados com muitos princípios da química verde. As propriedades bioativas de extratos vegetais são atribuídas à presença de metabólitos secundários (Ifesan, B.O.T. et al., 2013; Vaou, N. et al., 2021). Esses compostos são os principais responsáveis pelas funções adaptativas e de defesa inata das plantas (Kutchan, T.M. 2001).

Metabólitos secundários como os flavonóides são compostos que já foram utilizados como suplementos dietéticos e têm atividade antimicrobiana (Parhi, B., Bjarativa, D., Swain, S.K. 2020). Taninos foram aplicados desde curtimento do couro até pelos seus efeitos antitumorais e anti-oncogênicos (Pizzi, A. 2019). Saponinas já foram estudados quanto sua atividade anticolesterolêmica e anticancerígena (Güçlü-Üstündağ, Ö., Mazza, G. 2007). Antraquinonas são aplicadas a séculos como corantes, mas também apresentam aplicações médicas como laxante, antimicrobianos e anti-inflamatórios (Malik, E.M., Müller, C.E. 2016). Em alguns casos, o metabolismo desses compostos apenas é ativado em condições fisiológicas estressantes. Compostos antimicrobianos de plantas medicinais podem ter diferentes mecanismos de ação contra bactérias, fungos, vírus e protozoários em comparação com antimicrobianos utilizados pela indústria farmacêutica (Shankar, S.R. et al., 2010). Atualmente, uma porcentagem expressiva dos medicamentos prescritos é derivada de plantas, e estima-se que 60% dos antimicrobianos sejam fabricados a partir de produtos naturais, incluindo plantas (Gunjan, M. et al., 2015).

A atividade antioxidante dos extratos vegetais está associada à presença de compostos fenólicos, que são metabólitos secundários de diversas classes amplamente estudadas, incluindo flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos, etc (Ignat, I. Volf, I., Popa, V.I. 2011; Oroian, M. Escriche, I. 2015). A presença e a concentração de metabólitos secundários podem variar muito entre diferentes espécies de plantas (Heinonen, E.M. Meyer, A.S., Frankel, E.N. 1998). Formulações de medicamentos utilizando extratos de plantas ou metabólitos secundários de plantas são utilizadas para a prevenção e tratamento de várias doenças, incluindo condições

relacionadas à pele e até mesmo câncer de pele (Khalaf, N.A. et al., 2008; Khan, T. et al., 2019; Ijaz, S. et al., 2018). A atividade antioxidante está intimamente ligada à neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estudos têm mostrado que os compostos fenólicos são sequestradores de ROS eficientes. Esses compostos agem neutralizando os radicais livres, ajudando a proteger as células contra danos oxidativos (Durand, E. et al., 2017). Embora a funcionalidade antioxidante não esteja inerentemente interconectada com a eficácia antimicrobiana, certos compostos podem manifestar atributos duplos de ambas as atividades, suscitando a possibilidade de desenvolvimento de medicamentos multifuncionais. Por exemplo, certos polifenóis encontrados no chá verde e nas frutas vermelhas mostraram propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Merecz-Sadowska, A. et al., 2021).

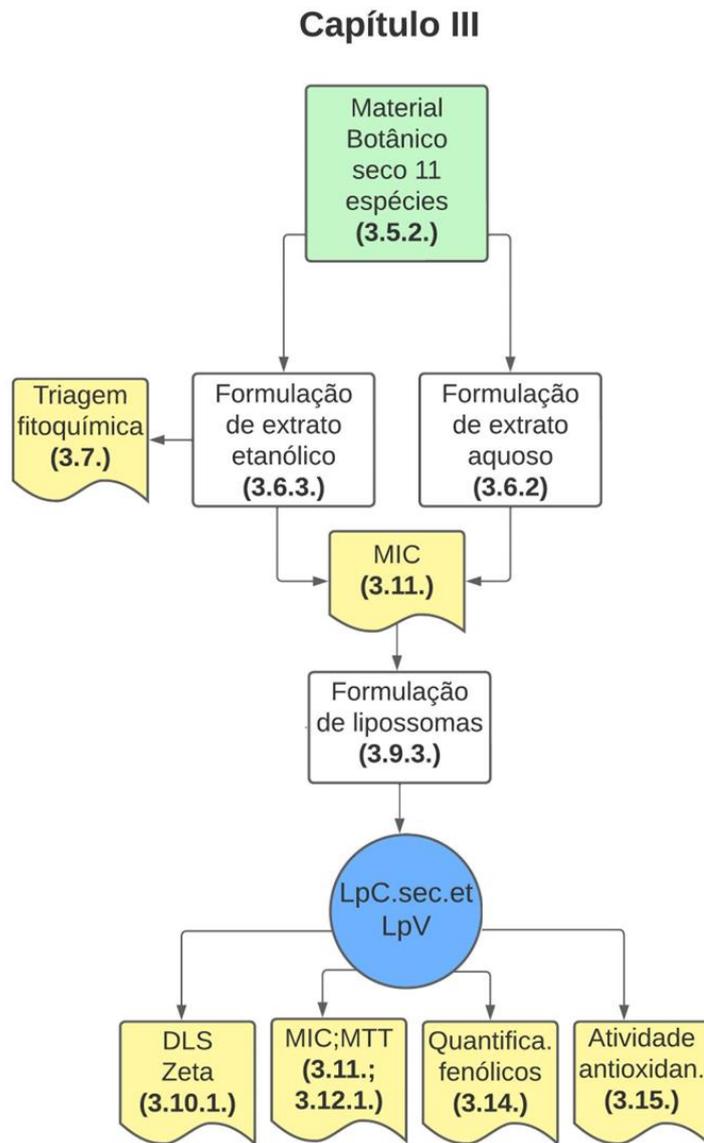
A pele, como nossa barreira mais externa, está exposta a muitos patógenos. As infecções por *Staphylococcus aureus* tornaram-se um problema de saúde pública, sobretudo devido ao aumento de cepas bacterianas altamente resistentes aos antibióticos convencionais (Pfalzgraff, A., Brandenburg, K., Weindl, G., 2018). Portanto, seria importante identificar compostos ativos naturais com propriedades antimicrobianas, que não sejam tóxicos para células eucarióticas e ainda possam ser veiculados em nanossistemas, como lipossomas, para desenvolver produtos para uso tópico. O propósito deste Capítulo III foi prospectar extratos vegetais utilizando solventes que atendam aos princípios verdes (água e etanol) e tenham produção de custo baixo, possam ser nanoestruturados na forma de lipossomas e que apresentem propriedades antimicrobianas e antioxidantes sem afetar expressivamente a viabilidade de células eucarióticas.

## 2. OBJETIVOS

- Realizar triagem fitoquímica de extratos a fim de definir à possível presença de classes de metabólitos secundários;
- Produzir formulações lipossomais à base de fosfolipídeos e extratos vegetais;
- Caracterizar os lipossomas por técnicas de espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletroforética;
- Testar os lipossomas quanto à possível atividade antibacteriana;
- Verificar a viabilidade celular de linhagem isolada de mamífero frente à lipossomas e extratos;
- Testar os lipossomas quanto à possível capacidade antioxidante.

### 3. METODOLOGIA

A estrutura da metodologia do presente Capítulo III está delineada na Figura III.2. Como foi informado na apresentação da Tese, uma explicação mais minuciosa dos materiais e métodos pode ser encontrada no Capítulo I.



**Figura III.2** – Fluxograma da metodologia empregada no Capítulo III da presente Tese. O retângulo em verde representa a etapa inicial de coleta de material botânico; retângulos brancos representam etapas intermediárias; formas de coloração amarela representam etapas de caracterização. A estrutura redonda azul demonstra quais nanomateriais foram produzidos (LpV e LpC.sec.et). As numerações em negrito abaixo de cada item do fluxograma indicam a seção na qual essa metodologia foi descrita no Capítulo I.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Triagem fitoquímica

Metabólitos secundários de plantas abrangem uma gama diversificada de compostos químicos que não são produzidos como parte do metabolismo primário das plantas, muitas vezes não essenciais para o crescimento. Dentro deste espectro, alcaloides, flavonoides e taninos desempenham papéis multifacetados, abrangendo aplicações na medicina, nutrição e indústria (Singh, R., et al., 2017). Por esse motivo, a triagem desses compostos em extratos vegetais torna-se imperativa já que possíveis aplicações podem ser identificadas.

De fato, considerando as espécies em avaliação nesta Tese, todas já foram avaliadas em algum nível quanto à presença de metabólitos secundários em extratos. Contudo, há ampla evidência no estado da arte de que mesmo que estudos anteriores atestem a presença de determinada classe de metabólitos secundários, isso não assegura que qualquer extrato com materiais oriundos da mesma espécie também terão a presença destes compostos. Isso se dá em função de diferentes condições extrativas, estágio de desenvolvimento, condições de cultivo, parte da planta, ou mesmo devido à diversidade genética das espécies (Prinsloo, G. Nogemane, N. 2018).

Estudos sobre triagem fitoquímica qualitativa de açafração também demonstraram a presença abundante de flavonoides e quantidades menores de saponinas, como confirmado na presente Tese, na qual também foi confirmada a presença de taninos. Estudos inferem que a presença de classes de metabólitos como taninos, saponinas e alcaloides na amostra podem ser responsáveis pelas atividades antimicrobiana, antimutagênica, anticancerígena, antileishmaniose, antioxidante e anti-gota do açafração (Albaquami, J.J. et al., 2022; Ullah, N., 2011).

Extrato de alfazema, reconhecida pela citotoxicidade apresentada, já demonstrou a presença de taninos e saponinas (Braguini, W.L., Alves, B.B., Pires, N.V., 2019), um achado consistente com o do presente estudo.

Cavalinha, conhecida por sua atividade anti-inflamatória e antidiabética, normalmente é utilizada no preparo de infusões utilizadas em banhos de pele. Já foi demonstrado, em estudo anterior, a presença de flavonoides, alcaloides, taninos e saponinas em extrato etanólico/aquoso de cavalinha (Hoque, A.S. et al., 2016). No presente estudo também foi verificada a presença das mesmas classes de compostos, com exceção de alcaloides que não foram testados.

Estudo anterior já demonstrou que o extrato metanólico de confrei apresenta mais reações positivas do que o extrato etanólico, no extrato etanólico 50%, já havia sido confirmada a presença de flavonoides, alcaloides e flavonas (Neagu, E., Păun, G., Radu, L.G., 2011). Na presente Tese com extrato etanólico 70% também foi confirmada a presença de flavonoides e saponinas.

Triagem fitoquímica dos extratos brutos de malva rosa havia indicado a presença de componentes bioativos como alcaloides, flavonoides, álcoois, fenóis, esteroides e taninos (Paltiyani, J.C., Dumale, J.V., Divina, C.C., 2017). Desses compostos aqueles testados no presente estudo (flavonoides e taninos) foram confirmados, mas também se detectou a presença de saponinas.

Estudo anterior com manjerição roxo demonstrou sua propriedade antifúngica e também indicou a presença de flavonoides, alcaloides, taninos e saponinas (Amadi, J.E., Salami, S. O., Eze, C.S. 2010). Quando estes achados são comparados com os presentes resultados não foi confirmada a presença de flavonoides, mas apenas de taninos e saponinas entre as classes de compostos testadas.

Uma triagem fitoquímica prévia do extrato etanólico/aquoso de orégano havia divulgado anteriormente flavonoides e taninos (Cortés-Chitala, M.d.C. et al., 2020), em alinhamento com os achados desta Tese. Esses compostos são reconhecidos por suas propriedades antioxidantes, sendo que suas presenças já foram documentadas em ambos extratos aquoso e etanólico, bem como em óleo essencial de orégano, amplificando ainda mais o potencial dos achados do presente estudo para esta espécie (Al-Hijazeen, M. et al., 2018; Capeka, E., Mareczek, A., Leja, M., 2005; Al-Bandak, G., Oreopoulou, V., 2007; Kosar, M., 2003).

Em extratos metanólicos de tomilho, autores evidenciaram a abundante presença de flavonoides (Hossain, M.A., et al., 2013), o que não foi verificado em extrato etanólico do presente estudo. Em outro estudo o extrato etanólico de tomilho indicou a presença de flavonoides, alcaloides, taninos e saponinas (Shaban, N.S. et al., 2015), mais uma vez com achados distintos do presente estudo no quesito de flavonoides, mas corroborando com taninos e saponinas. Esse tipo de diferença é comum na literatura científica referente a triagens fitoquímicas e podem ter diferentes possibilidades de explicação, particularmente devido às diferenças entre os materiais biológicos, variações de fatores abióticos e bióticos que as plantas estão expostas.

Notavelmente, os extratos de alfavaca, losna e sálvia exibiram exclusivamente saponinas, divergente dos dados da literatura que demonstram que em todas essas espécies já foram verificadas a presença de pelo menos flavonoides (Venuprasad, M.P. et al., 2014.; Boudjelal, A. et al., 2020; Afonso, A.F. et al., 2019). Um resumo de todos os resultados das reações pode ser encontrado na Tabela III.1.

**Tabela III.1** – Qualificação da presença ou ausência das classes de metabólitos secundários com base em cada reação.

Amostras	Flavonoides				Antraquinonas				Taninos			Saponinas		
	Shinoda	Cloreto de alumínio	Precip. de cloreto férrico	Caracterização de antocianos	Borntrager direta	Borntrager indireta	Precip. de cloreto férrico	Cloreto férrico	Proteína	Precip. de alcaloides	Acetato de cobre	Taninos condensados	Formação de espuma	Espuma resistente
Açafrão	+++++	+++	+++	++++	-	-	-	++	+	++	+++	+++	-	-
Alfavaca	+	-	+++	-	-	-	-	+++	-	++	+++	-	++	+
Alfazema	+++	-	++	+	-	-	-	+++	++	++	++++	++	++	+
Cavalinha	+	+	+++	-	-	-	-	+++	-	++	+	+	+	+
Confrei	++	+	+++	+	-	-	-	+++	-	++	++	-	+	+
Losna	+	-	+	-	-	-	-	++	-	++	++	-	+	+
Malva rosa	+	+	+++	+	-	-	-	+++	-	++	++	++	+	+
Manjericão	+	-	+++	-	-	-	-	+++	-	++	+	+	+	+
Orégano	++	+	+++	++	+	-	-	+++	++	++	++++	-	+	-
Sálvia	++++	-	++	-	-	-	-	+++	-	++	++++	-	+++	++
Tomilho	+++	+	+++	-	-	-	-	+++	++	++	++++	-	+	+

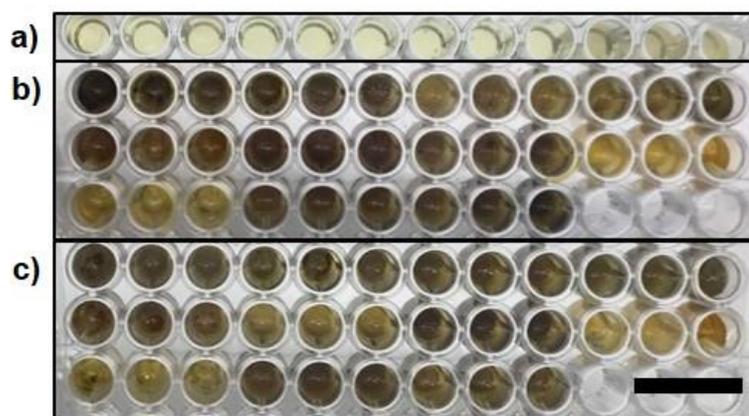
Nota: “+” indica a presença da classe de metabólitos secundários; “-” demonstra que a reação não indicou a presença da classe de metabólitos secundários. Um número maior de símbolos “+” indica uma reação visualmente mais expressiva. A coloração verde indica o resultado positivo para a classe de metabólitos secundários apresentada, com resultados positivos em  $\geq 80\%$  das reações.

De fato, com base nos presentes achados confrontados com aqueles disponíveis no estado da arte, é notória a importância da etapa de triagem fitoquímica para inferir sobre a presença de classes de compostos nos materiais botânicos e permitir correlação com os potenciais usos e atividades vislumbradas, além da definição do tipo de eventual nanossistema mais adequado à veiculação desses compostos presentes nos extratos.

#### 4.2. Ensaio de atividade antibacteriana dos extratos

Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram incubadas com extratos aquosos e etanólicos/aquosos por 24 h. Nessa avaliação visual não foi possível identificar se houve crescimento ou não de bactérias em função da turbidez do meio de cultivo devido à coloração

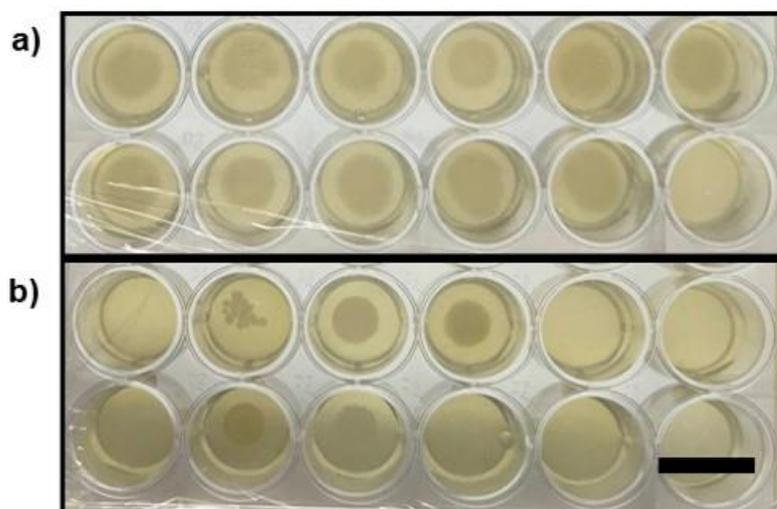
acentuada dos extratos como está demonstrado na Figura III.3. Assim, a avaliação da possível atividade antimicrobiana ocorreu 24 h após com a inoculação em meio LB sólido, conforme demonstrado na Figura III.4. Os resultados obtidos mostraram que nenhum extrato, seja aquoso ou etanólico/aquoso, apresentou atividade bactericida contra *E. coli*, porém em *S. aureus* os extratos etanólicos/aquosos de alfavaca, alfazema, manjeriçã, orégano, tomilho e sálvia exibiram atividade bactericida visto que não houve o crescimento em meio LB sólido.



**Figura III.3** – Detalhes de microplacas de 96 poços contendo extratos etanólicos/aquosos e controles incubados com bactérias em meio LB líquido. A) Demonstração com amostras em triplicatas, da esquerda para a direita, de antibiótico, meio LB, meio LB com água e meio LB inoculado com bactéria Gram-positiva. Em b) *E. coli* e c) *S. aureus*, as amostras são dispostas na seguinte ordem da esquerda para direita e de cima para baixo: alfavaca, confrei, malva rosa, losna, alfazema, manjeriçã, sálvia, açafreão, cavalinha, orégano e tomilho. A barra preta representa 1 cm.

Já foi demonstrado que os óleos essenciais de alfavaca e alfazema apresentam atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus* (Danh, L.T. et al., 2013; Hossain, M.A. et al., 2010) e o óleo essencial de orégano contra *E. coli* (Busatta, C. et al., 2007). Porém o processo de extração de óleos essenciais em geral é mais trabalhoso e oneroso do que a produção de um extrato etanólico/aquoso conforme demonstrado nesse trabalho, além do perfil de fitocompostos extraídos ser distinto. Estudos *in vitro* demonstraram que o manjeriçã *in natura*, que já é amplamente utilizado na culinária, apresenta aplicações medicinais e já existem 271 compostos ativos descritos (Ahmed, H.M. 2018). O extrato metanólico de sálvia também apresenta atividade antibacteriana contra *S. aureus* (Et-Touys, A. et al., 2016). Porém, nenhum desses estudos citados anteriormente compararam as atividades antimicrobianas em condições semelhantes de ensaios. Somente comparando as atividades nas mesmas condições torna-se possível inferir sobre o extrato de qual planta teria o uso mais indicado para determinada

atividade medicinal. Também nenhum desses estudos anteriores usavam extratos etanólicos/aquosos, ou mesmo comparavam todas essas espécies utilizando o mesmo tipo de extrato. O emprego de solventes verdes como a água e o etanol diminuem o custo de produção, já que ambos são solventes amplamente disponíveis e de baixo custo, sendo assim facilitaria uma futura pesquisa que explore um número de amostras maior. Essa utilização de solventes verdes (etanólico/aquoso) também é amigável ao meio ambiente quando comparada aos demais estudos citados que acabam usando solventes orgânicos potencialmente nocivos. A água e o etanol podem ser obtidos a partir de fontes renováveis, tem baixa toxicidade, baixo impacto ambiental e podem ser reciclados e reutilizados (Bubalo, M.C. et al., 2018).



**Figura III.4** – Detalhes de uma microplaca de 24 poços contendo extratos etanólicos/aquosos e controles incubados com bactérias em meio LB sólido. Cada poço representa uma amostra, começando pela primeira linha da esquerda para direita: alfavaca, confrei, malva, losna, alfazema, manjeriço, sálvia, açafraão, cavalinha, orégano, tomilho e antibiótico. O painel a) referente à bactéria *E. coli*, e o painel b) referente à bactéria *S. aureus*. A barra preta representa 1 cm.

Selecionar pelo menos 6 extratos (etanólicos/aquosos) de 22 extratos (11 aquosos e 11 etanólicos/aquosos) que tenham atividade contra *S. aureus*, que é uma bactéria que pode levar a complicações de pele e está comumente associada a infecções cutâneas e respiratórias, pode apresentar uma série de benefícios, sendo uma possibilidade para combinação com outros tratamentos e até mesmo uma possível alternativa aos antibióticos convencionais, sempre avaliando o baixo risco de efeitos colaterais sistêmicos.

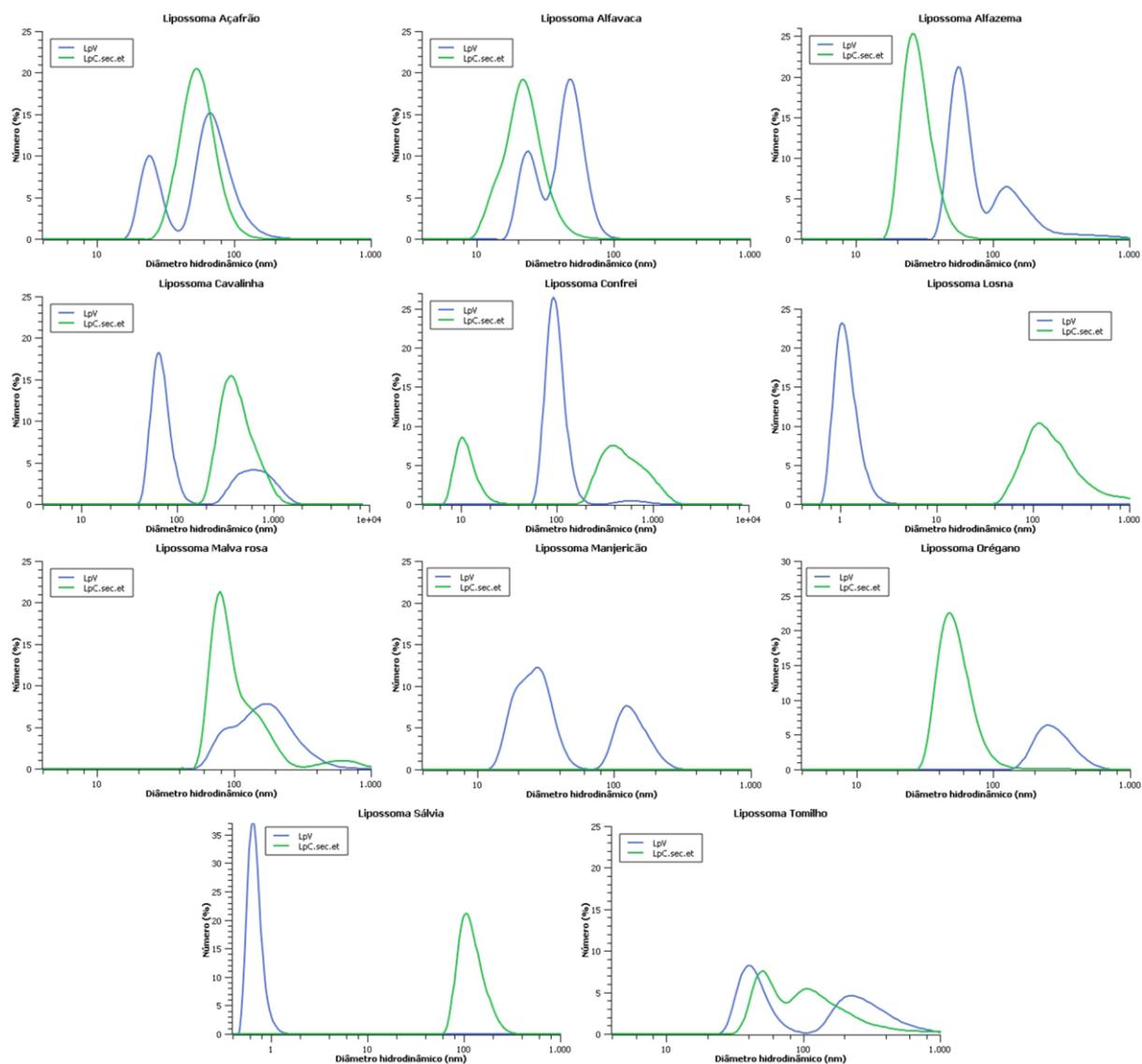
Correlacionando os extratos que apresentaram atividade com os metabólitos secundários presentes neles caracterizados durante a etapa de triagem fitoquímica, pode-se

observar que alfavaca e sálvia apresentaram apenas saponinas; alfazema, manjeriço e tomilho apresentaram taninos e saponinas; e orégano apresentou flavonoides e taninos, não sendo observado qualquer padrão que correlacionasse diretamente com os efeitos bactericidas. Estudo anterior demonstrou que a ação sobre microrganismos pode advir de uma classe de compostos predominante, apesar de também haver a possibilidade de a ação acontecer por um efeito sinérgico de compostos ativos (Pereira, V. et al., 2014). Percebendo que extratos etanólicos/aquosos foram os únicos que apresentaram atividade bactericida, com extratos de 5 espécies, a partir desse ponto o desenvolvimento da Tese se dará apenas com estes extratos.

### **4.3. Análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta (pZ)**

Os extratos utilizados no presente Capítulo III são exclusivamente etanólicos/aquosos na concentração de 2500 mg/mL, entretanto, os fosfolipídeos seguiram sendo extraídos do material botânico *in natura*. Então, os lipossomas foram sintetizados como LpV e LpC.sec.et. Os LpC deste capítulo apresentaram uma coloração mais intensa do que os do Capítulo II, uma vez que a concentração dos extratos utilizados foi maior. Os nanossistemas lipossomais não foram submetidos a processo de extrusão em membrana ou qualquer outra técnica para homogeneização das vesículas. Os lipossomas produzidos espontaneamente mediante reconstituição dos filmes lipídicos foram armazenados a 4°C até o momento de seu uso.

Amostras dos lipossomas foram diluídas 10× em água tipo I e avaliadas por DLS. Como pode ser visto na Figura III.5, somente o LpC.sec.et contendo extrato etanólico/aquoso de manjeriço não apresentou nanoestruturação com base nos resultados obtidos. Os LpC.sec.et contendo extrato de confrei e tomilho apresentaram duas subpopulações, enquanto losna e malva rosa apresentaram a formação em banda bastante larga, indicando que possivelmente também há mais de uma população nas amostras com tamanhos mais próximos. Todas as demais formulações lipossomais apresentaram somente uma população de partículas. O tamanho dos lipossomas é uma das características mais importantes, para aplicações em medicamentos. O diâmetro desejável de lipossomas varia de 50 a 200 nm (Leitged, M. Knez, Ž. Primožič, M. 2020). Das formulações obtidas nessa etapa, 9 dos 11 LpC.sec.et tiveram pelo menos uma subpopulação nessa escala de tamanho.



**Figura III.5** – Curvas de distribuição do tamanho (diâmetro hidrodinâmico) em número de LpV e LpC.sec.et produzidos com fosfolipídeos extraídos a partir de materiais biológicos *in natura* e extratos obtidos mediante material botânico seco de 11 diferentes espécies vegetais.

Igualmente importante o PDI fornece o índice de polidispersividade da amostra, quando se tratam de vesículas fosfolipídicas um  $PDI \leq 0,300$  é considerado como uma população homogênea, e  $\geq 0,700$  é considerado que a amostra tem uma distribuição de tamanho de partículas muito ampla (Danaei, M. et al., 2018). Quando avaliados os PDI dos nanossistemas produzidos, dados demonstrados na Tabela III.2, pode-se perceber que nenhuma amostra se apresentou como homogênea, sendo que a maioria delas demonstraram homogeneidade moderada (açafraão, alfavaca, alfazema, confrei, losna, orégano, tomilho e sálvia) e duas se demonstraram muito polidispersas (cavalinha e malva rosa), sendo que uma não demonstrou

nanoestruturação (manjeriço). Padrões e diretrizes mais específicos para a aceitabilidade da faixa de PdI para diferentes aplicações ainda precisam ser estabelecidos pelas agências reguladoras até mesmo as estrangeiras.

Avaliando o pZ percebe-se que as amostras de confrei e açafão apresentaram boa estabilidade coloidal ( $\pm 40$  a  $\pm 60$  mV), as amostras de orégano e tomilho apresentaram estabilidade moderada ( $\pm 30$  a  $\pm 40$  mV), e as demais amostras exibiram indicativo de estabilidade incipiente ( $\pm 10$  a  $\pm 30$  mV) de acordo com American Society for Testing and Material (1985).

**Tabela III.2** – Avaliação da média aritmética e do desvio padrão da média obtidos a partir de três leituras realizadas em modo automático para o índice de polidispersividade (PdI) e três leituras em modo manual 20 aquisições para o potencial Zeta (pZ) dos LpC.sec.et.

Característica	LpC.sec.et Açafão	LpC.sec.et Alfavaca	LpC.sec.et Alfazema
PdI	$0,566 \pm 0,095$	$0,611 \pm 0,148$	$0,508 \pm 0,059$
pZ (mV)	$-46,6 \pm 3,7$	$-23,1 \pm 1,2$	$-26,0 \pm 0,8$
Característica	LpC.sec.et Cavalinha	LpC.sec.et Confrei	LpC.sec.et Losna
PdI	$0,805 \pm 0,173$	$0,576 \pm 0,011$	$0,380 \pm 0,028$
pZ (mV)	$-13,5 \pm 1,6$	$-49,8 \pm 1,7$	$-10,1 \pm 2,1$
Característica	LpC.sec.et Malva rosa	LpC.sec.et Manjeriço	LpC.sec.et Orégano
PdI	$0,978 \pm 0,038$	-	$0,522 \pm 0,102$
pZ (mV)	$-5,5 \pm 1,2$	$-1,1 \pm 0,2$	$-32,8 \pm 1,0$
Característica	LpC.sec.et Tomilho	LpC.sec.et Sálvia	
PdI	$0,654 \pm 0,189$	$0,483 \pm 0,129$	
pZ (mV)	$-30,3 \pm 2,2$	$-9,7 \pm 3,6$	

De modo geral, quando comparados os PdI de LpC.sec.et com os LpC.in (dados Tabela II.1), a maioria das amostras permaneceu estatisticamente similar. Apenas os LpC.sec.et de açafão, losna, e malva rosa apresentaram maior valor de PdI quando comparados aos LpC.in correspondentes. Os LpC.sec.et de açafão, alfavaca, orégano e tomilho apresentaram pZ aumentado quando comparado aos LpC.in, mas foi observado menos pZ nas amostras de losna e malva rosa, sendo que as demais permaneceram estatisticamente semelhantes.

O aumento no valor de PdI pode estar relacionado com a maior concentração dos extratos vegetais testados. Para outros nanomateriais já foi demonstrado que com o aumento da concentração do precursor houve também um aumento do PdI (Zabetakis, K. et al., 2012), aqui

verificamos que ao aumentar a concentração do extrato vegetal a ser carregado também houve ou aumento do PdI, ou que, os mesmos se mantiveram estatisticamente iguais. Já quando considerado o pZ, outros estudos com lipossomas já demonstraram que com o aumento da concentração do princípio ativo que seria carregado não havia uma correlação direta com o pZ (Brgles, M. et al., 2008), conforme também observado no presente estudo.

Dos extratos que apresentam ação bactericida, os que tiveram nanoformulação averiguada foram os LpC.sec.et de alfavaca, alfazema, orégano, tomilho e sálvia, sendo os lipossomas formados com extrato de orégano aquele que se apresentou mais estável coloidalmente.

#### **4.4. Ensaio de atividade antibacteriana dos LpC.sec.et**

Em *E. coli* mais uma vez houve o crescimento de bactéria em todas as amostras, mesmo considerando a concentração muito mais alta testada nesta etapa (250 mg/mL). Outros estudos também já indicaram que bactérias Gram negativas são mais resistentes à ação de extratos de plantas. Um exemplo são os resultados de Yoda, Y. et al (2004), que demonstraram que extratos vegetais tiveram ação contra *E. coli* (Gram negativa) em uma concentração de 800 µg/mL, enquanto em *S. aureus* (Gram positiva) tiveram atividade utilizando uma concentração bem menor de 50 a 100 µg/mL. Também já foi demonstrado que o extrato aquoso de alho teve atividade contra bactérias Gram positivas, mas não apresentou atividade contra bactérias Gram negativas (Belguith, H. et al., 2010). Isso se deve ao fato de que as bactérias Gram negativas apresentam uma membrana externa de lipopolisacarídeos que bloqueia a entrada e a acumulação de moléculas presentes em extratos (Taylor, M. 2016).

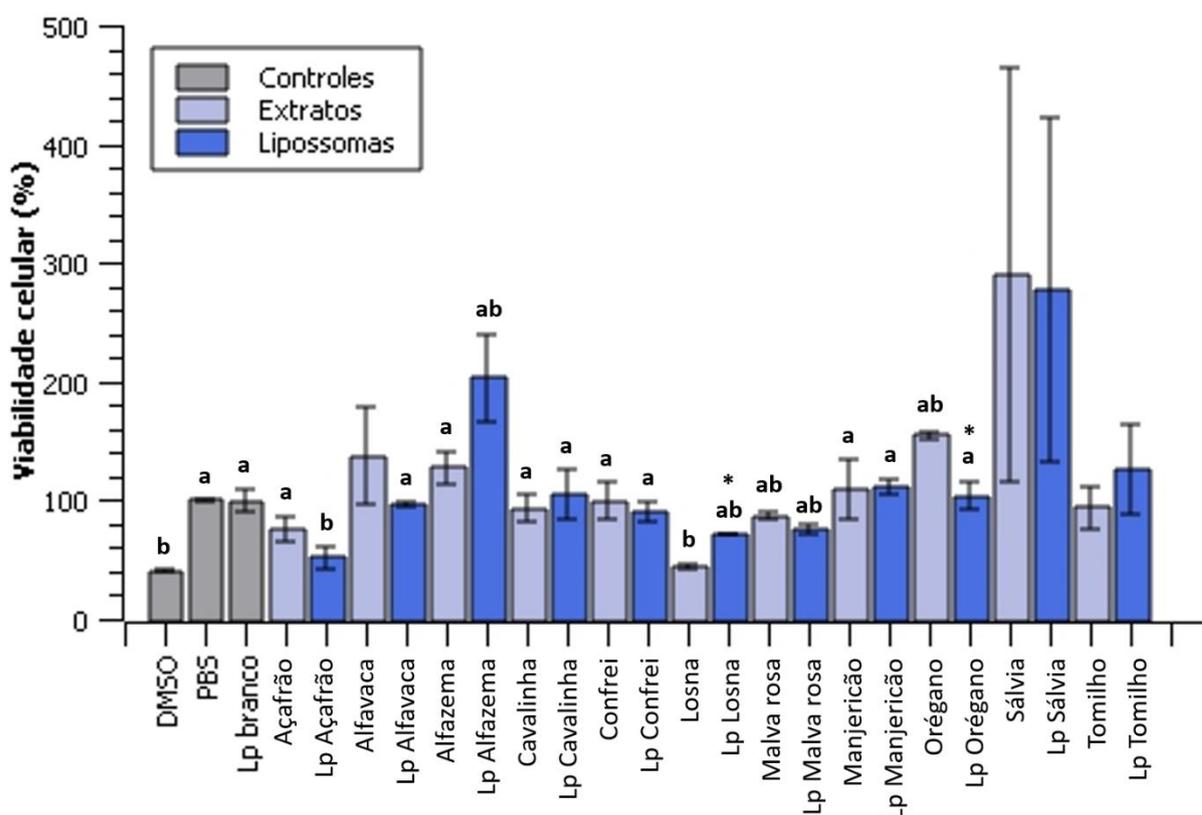
Já em *S. aureus* não houve o crescimento de bactérias nos extratos etanólicos/aquosos livres de alfavaca, alfazema, manjeriço, orégano, tomilho e sálvia, bem como nos LpC.sec.et de alfazema, manjeriço, orégano e sálvia. Contudo, quando nanoestruturados, os extratos etanólicos/aquosos de alfavaca e tomilho não apresentaram atividade bactericida. Um estudo demonstrou que a curcumina carregada em lipossoma revestido fez com que sua atividade fosse completamente inibida (Leo, V.D. et al., 2018), sendo que isso pode ter ocorrido por alguma formação de camada de solvatação dos extratos circundantes aos lipossomas. Comparando esse resultado com aqueles obtidos no capítulo anterior, observou-se ainda que em manjeriço não houve formação de nanossistemas detectáveis por DLS, então a atividade bactericida de LpC.sec.et de manjeriço deve ser equiparado com o extrato livre.

#### 4.5. Teste de viabilidade em linhagem celular de mamífero

Após serem cultivadas, as células JJ74A.1 foram contadas em uma câmara de Neubauer chegando a uma concentração de  $132 \times 10^4$  células/mL. Foram aplicadas em microplaca de 96 poços uma quantidade de  $1 \times 10^4$  células/poço e aplicados extratos e lipossomas na concentração de 250 mg/mL, sendo deixados incubados por 24 h. A concentração testada foi a mesma aplicada no teste antibacteriano para fins de comparação. Para calcular a viabilidade celular, foram consideradas que as leituras de absorbância das células controle, que ficaram apenas com o meio completo + PBS apresentaram viabilidade celular de 100% e assim calculado de modo relativo as demais porcentagens de viabilidade.

Os extratos vegetais livres e nanossistemas lipossomais contendo extratos vegetais que apresentaram viabilidade celular estatisticamente maior ao DMSO (controle positivo) foram: açafraão, Lp alfavaca, alfazema, Lp alfazema, cavalinha, Lp cavalinha, confrei, Lp confrei, Lp losna, malva rosa, Lp malva rosa, manjeriço, Lp manjeriço, orégano e Lp orégano, conforme mostrado na Figura III.6. As amostras que tiveram ação estatisticamente diferente ao meio de cultivo (controle negativo) foram: Lp açafraão, Lp alfazema, losna, orégano, cavalinha e alfazema; sendo que o extrato de losna foi a única amostra testada que diminuiu a viabilidade celular mais do que o controle positivo (DMSO).

As únicas amostras que foram estatisticamente diferentes comparando o Lp ao extrato foram losna e orégano. As amostras de extrato etanólico/aquoso de alfazema, manjeriço, orégano, Lp alfazema e Lp manjeriço apresentaram atividade antimicrobiana em *S. aureus* e não comprometeram a viabilidade celular em células eucariontes (foram estatisticamente iguais ao controle negativo). Esse resultado é interessante quando se trata de possíveis princípios ativos que possam ser utilizados na indústria farmacêutica. Amostras de Lp alfazema e extrato de orégano aumentaram a viabilidade das células eucariontes ( $P < 0,05$ ). As amostras de sálvia apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e também maior viabilidade celular, mas o grande erro padrão observado entre as réplicas nessas amostras pode sugerir uma interação entre a cor extraída durante a leitura, inclusive essas duas amostras não foram estatisticamente diferentes dos controles positivos ou negativos. Também não é possível confirmar que outros extratos não possam também ter interferido nas leituras realizadas no método colorimétrico visto que este costuma ser susceptível a interações cruzadas (Bruggisser, R. et al., 2002).



**Figura III.6** – Viabilidade celular (%) de J774A expostas aos extratos etanólicos/aquosos e os lipossomas correspondentes de diferentes espécies vegetais após 24 h de incubação. O método colorimétrico MTT foi utilizado para esta avaliação. A viabilidade celular é representada como PBS em 100% no controle negativo e DMSO como controle positivo. (a) Representa amostras estatisticamente diferentes de DMSO (controle positivo); (b) Representa que as amostras são estatisticamente diferentes do PBS (controle negativo); \* Indica que a amostra do lipossoma foi estatisticamente diferente do extrato que o mesmo veicula.

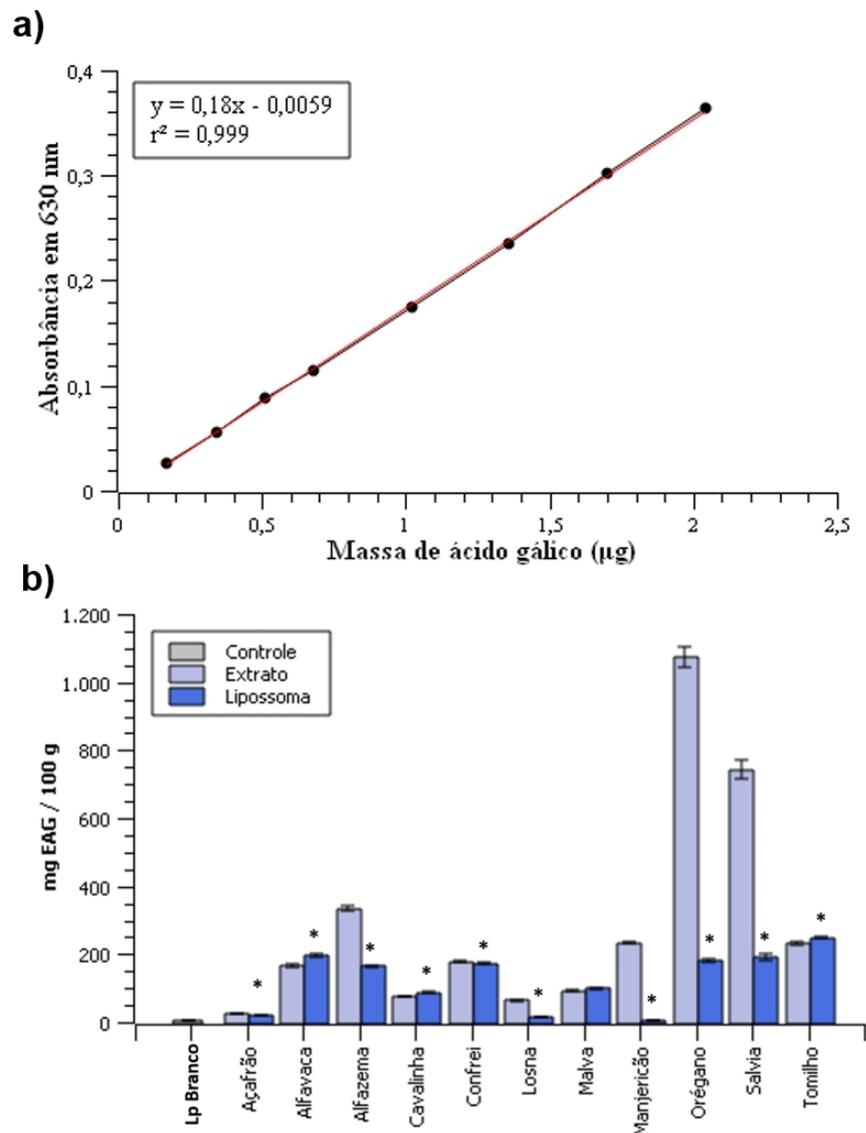
Os achados obtidos apresentam várias vantagens, incluindo eficácia possivelmente seletiva contra *S. aureus*, permitindo a possibilidade de controle da infecção sem prejudicar o organismo hospedeiro (Ahmed, N. et al., 2022; Kasugai, S., Hasegawa, N., Ogura, H. 1991; Chi, H-Y. et al 2007). Essa ação seletiva também pode minimizar o desenvolvimento de resistência a antibióticos, pois os bioativos naturais tendem a reduzir a pressão seletiva que impulsiona a evolução da resistência, tornando-os uma excelente opção para tratamentos de longo prazo (Salim, A. et al., 2022; Cohen, M.L. 1992). Além disso, a identificação de outros extratos com atividades antimicrobianas contra microrganismos específicos ou ações específicas em células eucarióticas como tumores abre caminhos para uma maior exploração em aplicações variadas.

Comparando com achados anteriores, os materiais botânicos que formaram lipossomas, tiveram ação bactericida e mantiveram a viabilidade de células JJ74A.1 (estatisticamente diferente do DMSO) foram apenas Lp de alfazema e Lp de orégano. O Lp de sálvia também poderia ser enquadrado nesse grupo, mas devido ao grande erro padrão observado entre as réplicas, não foi estatisticamente diferente do controle positivo (DMSO).

#### **4.6. Quantificação de compostos fenólicos totais**

Uma curva de calibração representando a absorvância do ácido gálico em um comprimento de onda de 630 nm com base na massa de ácido gálico diluído (Figura III.7 a), foi utilizada para determinar o resultado da massa equivalente (mg) de ácido gálico para cada 100 g da amostra de material botânico (Figura III.7 b). O extrato de orégano apresentou a maior equivalência de ácido gálico, conseqüentemente, o maior teor de compostos fenólicos, com 1075 mg de ácido gálico por 100 g de orégano. Por outro lado, lipossomas de manjeriço e açafreão apresentaram as menores composições fenólicas, sendo o primeiro com aproximadamente 6 mg de ácido gálico por 100 g de manjeriço.

Estudos anteriores identificaram no extrato metanólico de orégano compostos fenólicos como ácido rosmarínico, ácido cafeico e apigenina, sendo o ácido rosmarínico o principal composto (Exarchou, V. et al., 2022). O ácido rosmarínico é um potente composto antioxidante (Javanmardi, J. et al., 2022). Os flavonoides presentes no orégano e outras espécies estudadas nesta Tese são compostos benéficos para uso tópico, principalmente se apresentarem ações antioxidantes que protegem a pele contra os danos causados pelos radicais livres (Ware, I. et al., 2022), na triagem fitoquímica do extrato de orégano utilizado neste estudo, foram comprovados, além de flavonoides outras classes de metabólitos como taninos e saponinas. A sálvia também demonstrou uma alta concentração de compostos fenólicos, a maioria dos quais pode contribuir expressivamente para a atividade antioxidante total da sálvia (Wang, M. et al., 1998). Alguns estudos mostraram que a sálvia tinha o extrato mais rico em saponinas totais dentre os avaliados, apresentando melhores propriedades antioxidantes e maior atividade antimicrobiana (Generalic, I. et al., 2012; Fu, S. et al., 2010), mesma classe de metabólitos que foi encontrado na triagem fitoquímica desse extrato. Esses resultados destacam o potencial dos compostos fenólicos como ingredientes úteis em produtos tópicos para proteger a pele contra danos oxidativos e promover benefícios à saúde dérmica.



**Figura III.7** – Quantificação de fenólicos totais. O painel a) apresenta a curva de calibração obtida com leituras de absorvância no comprimento de onda de 630 nm (eixo y) em relação à massa de ácido gálico em  $\mu\text{g}$  (eixo x). Também demonstra a equação da reta obtida. O painel b) constitui a representação gráfica do equivalente de ácido gálico (mg) por 100 g de amostra (eixo y) e os extratos ou lipossomas contendo extratos (eixo x). As barras representam o desvio padrão da média das amostras. \* demonstra que as amostras de lipossomas e extratos da mesma espécie foram estatisticamente diferentes.

Com base nos resultados apresentados na Figura III.7, averigua-se que, quando comparado cada extrato etanólico/aquoso com o lipossoma correspondente, quase todas as amostras foram estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ ), exceto a amostra de malva rosa. De modo geral, quando o extrato estava encapsulado a lipossomas, a maioria apresentou uma quantificação de fenólicos totais menor do que o extrato livre. Isso ocorre possivelmente devido ao fato de não terem sido liberados de uma forma imediata nos ensaios, uma vez que o

encapsulamento lipossômico de compostos naturais tende a reduzir o contato do ativo com o meio exterior, protegendo-os da luz e de outros tipos de degradação (Habib, M.J. Asker, A.F. 1991; Monfardini, C. Veronese, F.M. 1998).

Dos dois tipos nanossistemas que até então apresentaram atividade antibacteriana e não foram citotóxicos contra a linhagem J774A.1 (Lp de Alfazema e Lp de Orégano), foram também aqueles que mais apresentaram compostos fenólicos totais em seus extratos.

#### **4.7. Ensaio de atividade antioxidante DPPH**

Um papel biológico dos antioxidantes é neutralizar radicais livres, sendo que por esse motivo diversos ensaios são baseados nessa atividade, como é o caso do DPPH. A avaliação da atividade antioxidante das amostras pelo método do DPPH revelou variação expressiva entre as espécies avaliadas, conforme demonstrado na Tabela III.3.

Dentre todos os lipossomas, as amostras provenientes de açafão, apresentaram a menor atividade antioxidante, seguida pela losna e cavalinha. As amostras com maior atividade antioxidante foram as provenientes de orégano, com quase 70% de inibição, mesmo na menor concentração, seguido de sálvia e alfazema. Estudo anterior também mostrou atividade antioxidante em um produto alimentício empregando o extrato etanólico de orégano (Amarowicz, R. et al., 2009). As altas capacidades de neutralização de radicais livres de diferentes extratos de orégano em vários ensaios já foram relatadas (Vichi, S. et al., 2001; Bertelli, D., Plessi, M., Miglietta, F., 2004). Portanto, neste estudo o extrato etanólico/aquoso de orégano mostrou-se promissor como fonte de antioxidantes naturais com potencial de uso em diversas áreas, incluindo a possibilidade de aplicações tópicas pelo encapsulamento em lipossomas. A sálvia também é reconhecida por apresentar uma quantidade expressiva de ácido ferúlico, ácido rosmarínico e apigenina, entre outros metabólitos secundários reconhecidos por sua capacidade antioxidante (Roby, M.H.H. et al., 2013). Em casos de lesões cutâneas, como queimaduras ou cortes, o aumento da produção de radicais livres pode prejudicar a capacidade de cicatrização. O uso de antioxidantes tópicos naturais pode auxiliar e acelerar o processo de cicatrização, reduzindo os radicais livres e modulando a inflamação (Qi, L. et al., 2022; Pizzale, L. et al., 2002; Phan, T-T. et al., 2001).

**Tabela III.3** – Demonstração da atividade antioxidante das amostras em relação ao percentual de neutralização (inibição) do DPPH para cada extrato etanólico/aquoso e seus respectivos LpC.sec.et. O ácido gálico atuou como controle positivo.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (mg/mL)</b>	<b>Porcentagem de inibição (%)</b>
Açafrão (extrato)	1,300	7,3 ± 1,2
Lp Açafrão	1,300	0,5 ± 2,5
Cavalinha (extrato)	1,300	36,8 ± 0,2
Lp Cavalinha	1,300	39,4 ± 0,0
Losna (extrato)	1,300	46,3 ± 0,5
Lp Losna	1,300	6,5 ± 2,8
Malva rosa (extrato)	1,300	55,5 ± 0,8
Lp Malva rosa	1,300	53,2 ± 1,0
Alfavaca (extrato)	0,430	51,9 ± 3,7
Lp Alfavaca	0,430	61,1 ± 1,9
Confrei (extrato)	0,430	60,2 ± 6,3
Lp Confrei	0,430	50,5 ± 2,4
Manjeriço (extrato)	0,430	70,2 ± 0,0
Lp Manjeriço	0,430	1,9 ± 7,8
Tomilho (extrato)	0,430	68,8 ± 0,3
Lp Tomilho	0,430	69,9 ± 0,0
Alfazema (extrato)	0,216	70,2 ± 0,3
Lp Alfazema	0,216	66,2 ± 1,3
Salvia (extrato)	0,216	63,1 ± 1,7
Lp Salvia	0,216	67,1 ± 1,2
Orégano (extrato)	0,086	69,9 ± 0,0
Lp Orégano	0,086	69,9 ± 0,5
Controle ácido gálico	0,0017	74,8 ± 0,8

Das amostras verificadas, extratos etanólicos/aquosos e LpC.sec.et de Orégano e Alfazema foram as que mais se destacaram, apresentando atividade antimicrobiana, não citotoxicidade contra células JJ74A.1, altos teores de compostos fenólicos totais e ainda uma das maiores capacidades antioxidantes.

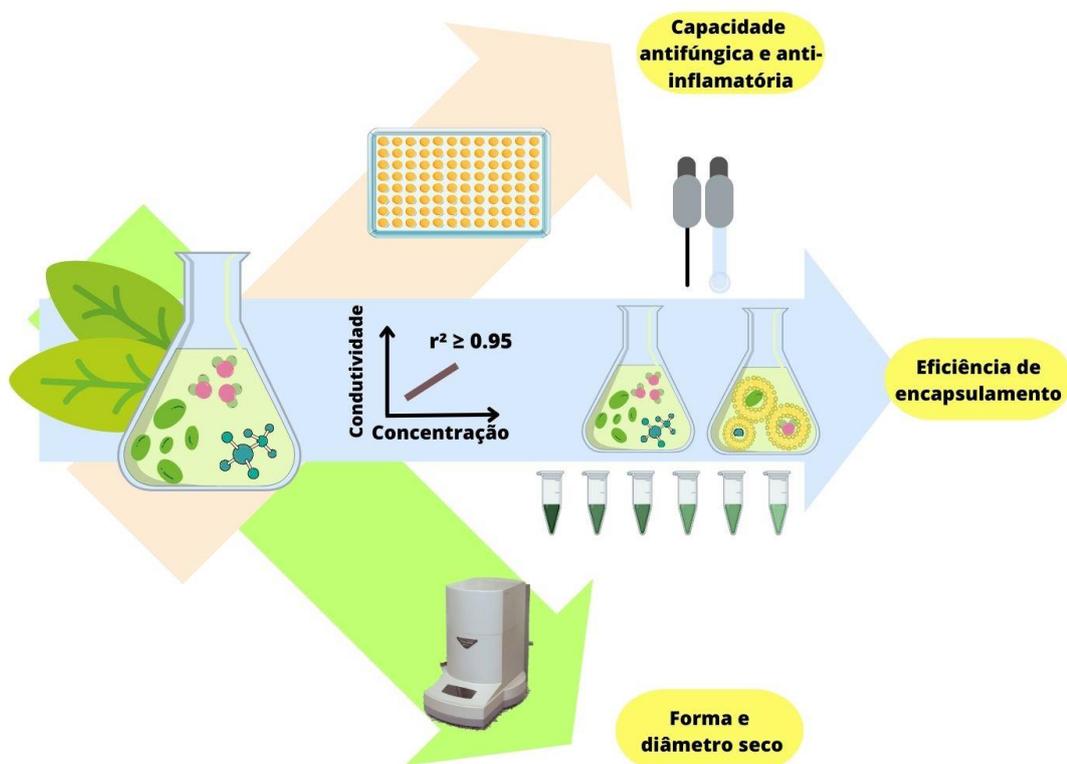
## 5. CONCLUSÕES PARCIAIS

No presente Capítulo III avaliou-se 11 extratos aquosos, 11 extratos etanólicos/aquosos e mais 11 lipossomas contendo os extratos etanólicos/aquosos. Apenas as amostras (extratos etanólicos/aquosos e LpC.sec.et) advindos de alfazema e orégano exibiram multifuncionalidade quanto à atividade bactericida contra *S. aureus*, possibilitaram nanoestruturação lipossomal, não comprometeram a viabilidade de células eucarióticas, tiveram altos teores de quantificação de fenólicos totais e também alta atividade antioxidante. O uso dessas amostras representa uma opção para futuras pesquisas e desenvolvimento de produtos bioativos, como por exemplo de uso tópico. À medida que as diversas propriedades dos extratos botânicos são desvendadas, seus papéis em potencial na promoção da saúde da pele e no combate às infecções torna-se cada vez mais evidente. Essas descobertas encorajam novas investigações para aproveitar esses compostos naturais no tratamento de problemas dermatológicos e na promoção do bem-estar geral e na sua entrega por *nanodelivery*.

Para confirmar que essas amostras são adequadas para futuras aplicações será necessária uma série de caracterização das mesmas, a fim de compreender suas propriedades físicas e estruturais no intuito de garantir a qualidade e desempenho de suas aplicações, com alguns resultados que corroboram tais aspectos que serão apresentados no Capítulo IV.

## CAPÍTULO IV

### CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DOS LIPOSSOMAS VEGETAIS: UM ESTUDO CONFIRMATÓRIO



**Figura IV.1** – Resumo gráfico do Capítulo IV, com caracterização biológica frente a levedura, avaliação da forma e diâmetro seco, e eficiência de encapsulamento.

## Resumo

Lipossomas têm seu uso muito versátil na indústria, mas o fato é que para sua aplicação, caracterizações extensas são necessárias. No presente Capítulo IV, focando em futura aplicação tópica, uma atuação biológica em fungos (levedura) foi analisada, juntamente com avaliações de suas características físicas, incluindo avaliação da eficiência de encapsulamento (EE) e determinação do “diâmetro seco”. Extratos vegetais ricos em compostos ativos contra microrganismos e com potencial fitoterápico são valiosos, mas sua rápida oxidação requer encapsulamento. No entanto, a composição variável dos extratos dificulta a quantificação da EE, muitas vezes realizada por métodos onerosos como cromatografia e exigindo padrões específicos muitas vezes indisponíveis. Uma abordagem inventiva foi realizada utilizando a condutividade elétrica para quantificar o encapsulamento. Foi possível a nanoestruturação e caracterização de 8 nanossistemas. Além disso, dois nanossistemas tiveram atividade fungistática sobre *S. cerevisiae* (LpC.sec.et de alfazema e LpC.sec.et de orégano) e apenas 1 atividade fungicida (LpC.sec.et de orégano). Também conseguiu-se quantificar a EE pelo método inventivo desenvolvido, sendo que os LpC.sec.et de orégano e alfazema que até aqui apresentaram melhores resultados contra microrganismos tiveram suas EE quantificadas em aproximadamente 91,70% e 56,33%, respectivamente. As caracterizações dos LpV e LpC.sec.et oriundos do material botânico de orégano por microscopia de força atômica (MFA) revelaram diâmetro pela altura (Z) média de 33,9 e 46,11 nm, respectivamente; que os fosfolídeos extraídos do material botânico apresentam um pico de degradação próximo a da lectina de soja (346,6°C); e por fim, revelaram também que extrato e LpC de orégano aumentam a viabilidade celular e a produção de espécies reativas em sangue periférico bovino. Este Capítulo permitiu uma caracterização mais aprofundada dos lipossomas vegetais, com destaque para os lipossomas provenientes do material botânico de orégano. Esses resultados fornecem informações valiosas para compreender o potencial dos lipossomas como veículos de entrega de compostos bioativos não isolados.

**Palavras-chave:** atividade antifúngica, condutividade elétrica, taxa de encapsulamento, MFA de lipossomas

## Abstract

Liposomes have a very versatile use in industry, but the fact is that for their application, extensive characterizations are necessary. In this Chapter IV, focusing on future topical application, biological action on fungi (yeast) was analyzed, together with evaluations of their physical characteristics, including evaluation of encapsulation efficiency (EE) and determination of “dry diameter”. Plant extracts rich in compounds active against microorganisms and with phytotherapeutic potential are valuable, but their rapid oxidation requires encapsulation. However, the variable composition of the extracts makes it difficult to quantify EE, which is often carried out using expensive methods such as chromatography and requiring specific standards that are often unavailable. An inventive approach was taken using electrical conductivity to quantify encapsulation. The nanostructuring and characterization of 8 nanosystems was possible. Furthermore, two nanosystems had fungistatic activity on *S. cerevisiae* (LpC.sec.et from lavender and LpC.sec.et from oregano) and only 1 fungicidal activity (LpC.sec.et from oregano). It was also possible to quantify EE using the inventive method developed, with the LpC.sec.et of oregano and lavender, which have so far shown the best results against microorganisms, having their EE quantified at approximately 91.70% and 56.33%, respectively. The characterizations of LpV and LpC.sec.et from oregano botanical material by atomic force microscopy (MFA) revealed an average diameter by height (Z) of 33.9 and 46.11 nm, respectively; that the phospholipids extracted from the material botanical have a degradation peak close to that of soy lectin (346.6°C); and finally, they also revealed oregano extract and LpC increase cell viability and the production of reactive species in bovine peripheral blood. This Chapter allowed a more in-depth characterization of plant liposomes, with emphasis on liposomes originating from the botanical material of oregano. These results provide valuable information to understand the potential of liposomes as delivery vehicles for non-isolated bioactive compounds.

**Keywords:** fungicide activity, conductivity, encapsulating rate, AFM of liposomes.

## 1. INTRODUÇÃO

Os lipossomas têm inúmeras aplicações, seja na nanomedicina, na indústria de alimentos e até mesmo na agricultura (Malheiros, P.S., Daroit, D.J., Brandelli, A. 2010; Daraee, H.D. et al., 2016; Taylor, T.M., et al., 2007; Gao, Y. et al., 2023). O carregamento de moléculas em sistemas lipossomais oferece uma maior estabilidade para o composto veiculado e também a possibilidade de liberação sustentada do mesmo (Dravid, A.A. et al., 2023). Os extratos de origem vegetal têm inúmeros compostos que podem ter atividade contra microrganismos como a levedura *S. cerevisiae*, um bom modelo não patogênico para *Candida albicans* (Akbar, W.A.S. et al., 2023; Tayel, A.A. et al., 2018), ou até mesmo podem ser utilizados como fitoterápicos (Dutta, T. et al., 2022).

Os metabólitos secundários são os fitocompostos que são aplicados na medicina e apresentam inúmeras atividades. Porém, os extratos vegetais passam por processos de oxidação muito rápidos (Poudel, A. et al., 2022), então há necessidade que extratos vegetais estejam encapsulados e conseqüentemente mais protegidos da deterioração. Um dos desafios nessa área é que os compostos presentes em extratos são muito variados em composição e abundância, então a quantificação do encapsulamento costuma ser possível apenas mediante técnicas muito onerosas e laboriosas como cromatografias (Bian, J., 2022). Estas técnicas envolvem o isolamento e identificação de cada composto presente em amostras botânicas. Uma das abordagens alcançadas no presente trabalho foi utilizar um sensor de condutividade elétrica para quantificar a eficiência de encapsulamento (EE) total, sem a necessidade de prévio isolamento das moléculas. Essa abordagem se dá em função de que a quantificação da EE é crucial em aplicações médicas e biológicas.

A condutividade elétrica avalia a capacidade de condução de eletricidade de acordo com a concentração dos sólidos totais dissolvidos em uma amostra (Rhoades, J.D. 1996). Estudos recentes demonstraram que inúmeros fatores podem afetar a condutividade elétrica, como a natureza do material, forma e tamanho dos sólidos dissolvidos (Kljusurić, J.G., Benković, M., Bauman, I. 2015). Ou seja, para cada modelo há a necessidade de entender a correlação entre o modelo proposto e o valor experimental da condutividade elétrica. Então, conseguir correlacionar positivamente a concentração de extrato com a condutividade elétrica e conseqüentemente avaliar a EE é uma abordagem inovadora para uma questão que se apresenta na nanobiotecnologia.

Outro aspecto recorrente durante a análise de lipossomas e outros tipos de nanossistemas envolve a visualização dos nanossistemas. Nesse sentido, a MFA é uma técnica não óptica de alta resolução que pode ser utilizada para caracterizar amostras e superfícies biológicas. O instrumento determina a topografia de uma amostra, sendo assim é possível utilizá-lo para comparação de lipossomas vazios e carregados com extratos vegetais. Uma vantagem do uso da MFA em relação a outras técnicas como a microscopia eletrônica vem do fato de que não há necessidade de fixação química da amostra para obtenção de resultados de alta qualidade (Engelhardt, K., Price, E., Bakowsky, U. 2023).

Com base no exposto, o propósito deste Capítulo IV foi caracterizar os lipossomas que se mostraram mais promissores quanto às funcionalidades pretendidas nos Capítulos anteriores, a fim de compreender melhor suas características físicas e biológicas.

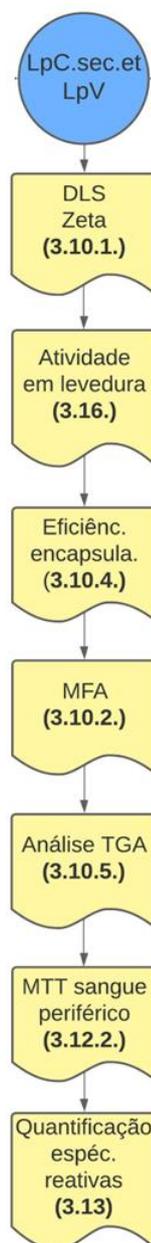
## 2. OBJETIVOS

- Produzir formulações lipossomais à base de fosfolípídeos e extratos vegetais;
- Caracterizar os lipossomas por técnicas de espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletroforética;
- Testar os lipossomas quanto à possível atividade sobre levedura;
- Quantificar fenólicos totais em lipossomas e extratos livres;
- Caracterizar os lipossomas por microscopia de força atômica;
- Determinar a eficiência de encapsulamento de extratos nos lipossomas produzidos;
- Caracterizar os lipossomas por termogravimetria;
- Verificar a viabilidade celular de sangue periférico bovino frente à lipossomas e extratos;
- Verificar a produção de espécies reativas em células de mamíferos frente à lipossomas e extratos.

### 3. METODOLOGIA

A Figura IV.2 fornece um resumo da metodologia utilizada no Capítulo IV. Informações mais detalhadas sobre os materiais e métodos estão disponíveis no Capítulo I.

#### Capítulo IV

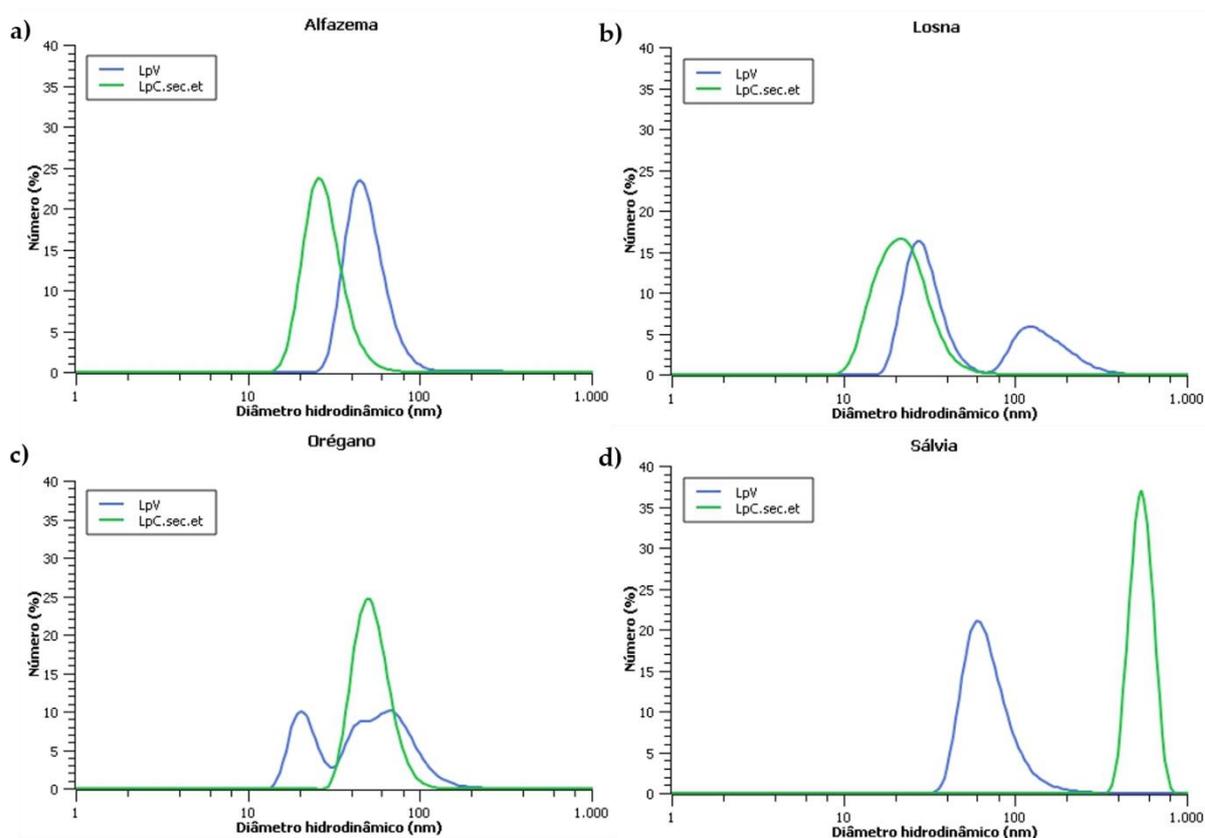


**Figura IV.2** – Fluxograma da metodologia empregada no Capítulo IV da presente Tese. Sendo o círculo em azul representa os lipossomas produzidos no Capítulo III e as formas de coloração amarela representam as etapas de caracterização. As numerações em negrito abaixo de cada item do fluxograma indicam a numeração da seção na qual essa metodologia foi descrita no Capítulo I.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta (pZ)

Para análise nesse Capítulo IV foram formulados novos lotes de lipossomas (LpV e LpC.sec.et) de alfazema, losna, orégano e sálvia. Os lipossomas de alfazema e orégano foram selecionados, pois foram os que tiveram resposta positivas em todos os ensaios do Capítulo III. Os lipossomas de sálvia foram selecionados por não terem apresentado todos os atributos desejáveis em apenas um teste (MTT do Capítulo III) e os lipossomas de losna também foram selecionados como um controle, visto que não apresentou resultados desejáveis para nenhum dos testes do Capítulo III. Novos lotes dos lipossomas foram formulados a fim de que o teste de atividade e principalmente as análises físicas (EE e MFA) fossem realizados com amostras recém produzidas.



**Figura IV.3** – Distribuição de tamanho (diâmetro hidrodinâmico), em número, de lipossomas produzidos a partir de fosfolipídios extraídos de várias plantas: (a) alfazema, (b) losna, (c) orégano e (d) sálvia. Os lipossomas são carregados com água tipo I (linha azul, lipossoma vazio) ou fito-extrato etanólico/aquoso da mesma planta como fonte de fosfolipídeos (linha verde, lipossoma completo).

Todos os oito nanossistemas exibiram a formação de nanoestruturas, conforme observado por meio da análise realizada por DLS. No entanto, especificamente no caso da sálvia, foi observado um aumento notável em DH quando comparado o lipossoma cheio ao vazio, conforme ilustrado na Figura IV.3. Pesquisas anteriores demonstraram que não havia alteração significativa do tamanho dos lipossomas quando eles estavam vazios ou carregados de ativos (Gortzi, O. et al., 2008; Ai, Y. et al., 2022). Resultado similar também foi verificado em 3 dos 4 tipos de lipossomas formulados.

Ao submeter extratos individuais à análise por DLS, nenhum deles apresentou evidência da formação de estruturas na escala nanométrica (0 a 1000 nm) e sim de alguns aglomerados de moléculas presentes nos extratos na escala micrométrica. No caso do extrato orégano, o processo de leitura foi encerrado pelo aparelho, sugerindo a completa ausência de nano ou microestruturas.

Conforme ilustrado na Tabela IV.1, os valores dos PdI para as amostras de alfazema indicaram equivalência estatística entre o extrato e o LpC, com valores registrados de  $0,385 \pm 0,004$  e  $0,407 \pm 0,044$ , respectivamente. De todo modo, LpC e extrato de alfazema demonstraram menor polidispersão do que o LpV. Já para o pZ houve um aumento, em módulo, estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ) apenas quando se tratava do LpC, indicando assim maior estabilidade das amostras. Além disso, a Cnd-EM apresentou valores mais altos tanto para o extrato quanto para o LpC, quando comparados com o LpV.

Dentre as amostras da espécie de losna, nenhuma variação estatisticamente significativa foi observada em relação aos valores de PdI e avaliando o pZ, um aumento notável e estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ) no valor do módulo foi observado no LpC ( $-34,4 \pm 3,3$  mV) em comparação com o extrato ( $-14,0 \pm 0,6$  mV) e LpV ( $-14,4 \pm 0,6$  mV). Além disso, a Cnd-ME apresentou diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre todas as amostras, com o aumento pronunciado ocorrendo na formulação LpC desta espécie.

No caso do orégano, a avaliação do PdI não foi bem sucedida para o extrato devido ao abortamento da leitura do equipamento, sugerindo fortemente a ausência de nano e microestruturas. Digno de nota, o LpC desta espécie apresentou uma redução estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em PdI ( $0,488 \pm 0,056$ ) em comparação com o LpV ( $0,686 \pm 0,104$ ). Analisando o pZ das amostras produzidas com orégano, ficou evidente que a formação de lipossomas levou a um aumento substancial no valor do módulo em comparação com o extrato livre. Além disso, a Cnd-ME também aumentou notavelmente com a formulação de LpC.

Nas amostras da espécie sálvia, o PdI exibiu distinções entre as três amostras, com o menor valor sendo observado para o LpV ( $0,318 \pm 0,034$ ) e o maior valor para o LpC ( $0,984 \pm 0,028$ ). O pZ permaneceu estatisticamente similar entre o extrato e o LpC, com apenas o LpV exibindo um valor de módulo menor quando comparado aos demais ( $-11,5 \pm 1,5$  mV). Da mesma forma, a Cnd-ME demonstrou semelhança estatística entre o extrato e o LpC, os quais por sua vez foram estatisticamente diferentes em relação ao LpV. Ao comparar o LpC de sálvia com o extrato livre, diferenças são evidentes em termos de DH e PdI. No entanto, o pZ e o Cnd-ME permaneceram estatisticamente inalterados, sugerindo a possibilidade EE baixa para o extrato desta espécie em particular. Essa tendência ressoa com pesquisas envolvendo outros sistemas de aprisionamento nanoestruturados, em que uma baixa EE não ocasionou alterações notáveis no pZ (Kirchherr, A-K., Briel, A., Mäder, K. 2009). Os aumentos observados nos PdI e DH podem ser atribuídos à presença de fosfolipídeos na amostra.

**Tabela IV.1** – Índice de polidispersividade (PdI), potencial Zeta (pZ) e condutividade elétrica (Cnd-ME) obtidos para o extrato, lipossoma vazio (LpV) e lipossoma completo (LpC.sec.et). Os valores representam a média aritmética e o desvio padrão dos valores médios obtidos de três leituras independentes.

Característica	Amostra	Alfazema	Losna	Orégano	Sálvia
PdI	Extrato	$0,385 \pm 0,004$	$0,406 \pm 0,007$	$\emptyset$	$0,657 \pm 0,069$
	LpV	$0,604 \pm 0,017^{ac}$	$0,460 \pm 0,027$	$0,686 \pm 0,104$	$0,318 \pm 0,034^{ac}$
	LpC.sec.et	$0,407 \pm 0,044$	$0,444 \pm 0,047$	$0,488 \pm 0,056^b$	$0,984 \pm 0,028^{ab}$
pZ (mV)	Extrato	$-14,0 \pm 0,6$	$-23,3 \pm 0,5$	$-2,7 \pm 0,4^{bc}$	$-18,9 \pm 1,6$
	LpV	$-14,4 \pm 0,6$	$-22,2 \pm 2,2$	$-28,2 \pm 0,8$	$-11,5 \pm 1,5^{ac}$
	LpC.sec.et	$-34,4 \pm 3,3^{ab}$	$-32,3 \pm 4,0^{ab}$	$-27,1 \pm 4,8$	$-21,1 \pm 0,5$
Cnd-ME (ms/cm)	Extrato	$0,288 \pm 0,004^{bc}$	$0,220 \pm 0,002^{bc}$	$0,299 \pm 0,005^b$	$1,410 \pm 0,077^b$
	LpV	$0,006 \pm 0,001^{ac}$	$0,009 \pm 0,001^{ac}$	$0,015 \pm 0,063^{ac}$	$0,014 \pm 0,005^{ac}$
	LpC.sec.et	$0,230 \pm 0,003^{ab}$	$0,238 \pm 0,002^{ab}$	$0,322 \pm 0,005^b$	$1,420 \pm 0,077^b$

A análise estatística foi realizada usando comparações pareadas por One-Way ANOVA ( $P < 0,05$ ). As comparações foram feitas entre amostras da mesma espécie, incluindo: LpV (contendo apenas água), LpC.sec.et (contendo extrato vegetal etanólico/aquoso) e o extrato original. “a” indica uma amostra estatisticamente diferente do extrato da própria espécie; “b” indica uma amostra estatisticamente diferente do lipossoma vazio de sua própria espécie; “c” indica uma amostra que é estatisticamente diferente do lipossoma completo de sua própria espécie.

Estudo anterior já demonstrou que um aumento (em módulo) do pZ pode indicar interações entre o princípio ativo carregado e fosfolipídeos, indicando assim o sucesso do encapsulamento (Honary, S., Zahir, F. 2013). Observa-se alteração significativa quando se compara pZ do extrato e LpC nas amostras de alfazema, losna e orégano. Esses aumentos

estatisticamente significativos em módulo do pZ, quando comparado ao extrato, sugerem o potencial encapsulamento de compostos bioativos. Contudo, esta tendência não foi observada para a sálvia, onde a mudança em módulo do pZ não foi estatisticamente significativa quando comparada ao extrato livre.

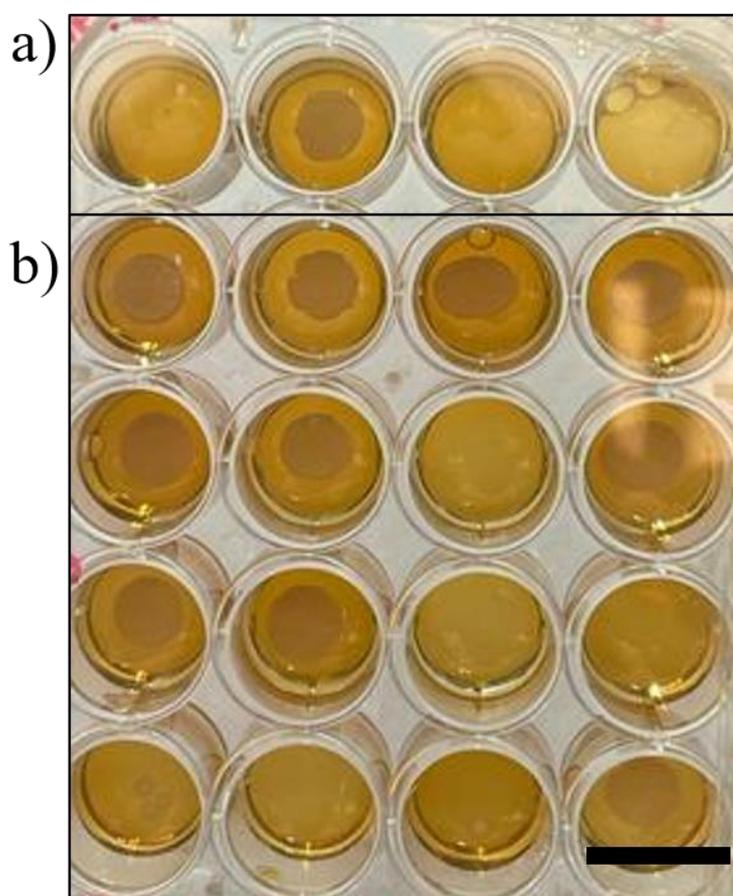
Um aumento substancial em Cnd-ME foi observado em LpC em comparação com o seu respectivo extrato em losna. Já na espécie alfazema foi observada uma diminuição na Cnd-ME após a formulação do LpC em comparação com o extrato, enquanto nenhuma mudança estatisticamente significativa em Cnd-ME foi observada na amostra de orégano e sálvia. Além disso, um estudo relatou que um aumento no tamanho de partículas pode resultar em Cnd inalterada ou diminuída (Xu, Y., Hanna, M.A. 2006), conforme observado na amostra de sálvia. Outro estudo mostrou que a Cnd de extratos não varia significativamente ao longo do tempo (Em, M., Pratley, J.E., Haig, T. 1997), permitindo assim uma futura caracterização de EE mesmo que os extratos tenham sido produzidos dias antes.

#### **4.2. Ensaio de atividade em levedura**

Com 24 h de ensaio em levedura *S. cerevisiae*, percebeu-se que da mesma forma como havia ocorrido nos ensaios em bactérias mais uma vez não seria possível averiguar o crescimento do microrganismo diretamente por inspeção visual devido à coloração dos extratos. Então, após 24 h e 48 h foram coletados 2 µL de cada suspensão e inoculados em meio YEPD sólido para averiguar o possível crescimento de leveduras em cada amostra ou confirmar eventual atividade leveduricida. Como pode-se perceber na Figura IV.4 nenhum LpV inibiu o crescimento da levedura *S. cerevisiae*; dos extratos livres apenas o extrato de sálvia inibiu o crescimento da levedura em 24 h; e das amostras de LpC.sec.et avaliadas em 24 h, apenas as amostras de orégano e alfazema inibiram o crescimento. Entretanto, avaliando as placas após 48 h apenas o LpC.sec.et de orégano permaneceu inibindo o crescimento de *S. cerevisiae*, apresentando ação leveduricida.

*S. cerevisiae* é uma levedura benigna com vastas aplicações biotecnológicas e normalmente é um modelo não patogênico utilizado para os dois principais patógenos fúngicos de humanos *Candida albicans* e *Candida glabrata* (Diezmann, S., 2014). Entender como os lipossomas e extratos atuam em *S. cerevisiae* é importante para inferir sobre futuras aplicações contra infecções fúngicas em humanos.

O óleo essencial de orégano já foi relatado previamente com atividade contra o microrganismo modelo *S. cerevisiae*, inclusive demonstrando que células tratadas por esse óleo tiveram suas membranas expressivamente danificadas (Chami, F. et al., 2005). Entretanto, ainda não há relatos sobre os efeitos do extrato etanólico/aquoso, sendo que a obtenção do extrato é muito mais fácil obtenção. Também já foi relatado na literatura que emulsões contendo óleo essencial de orégano associado com resveratrol apresentaram atividade contra a bactéria *S. aureus* e também contra a levedura *S. cerevisiae* para utilização em produtos alimentícios (Ai, Y. et al., 2022), ambos microrganismos que também foram inibidos pelo lipossoma contendo extrato etanólico/aquoso de orégano.



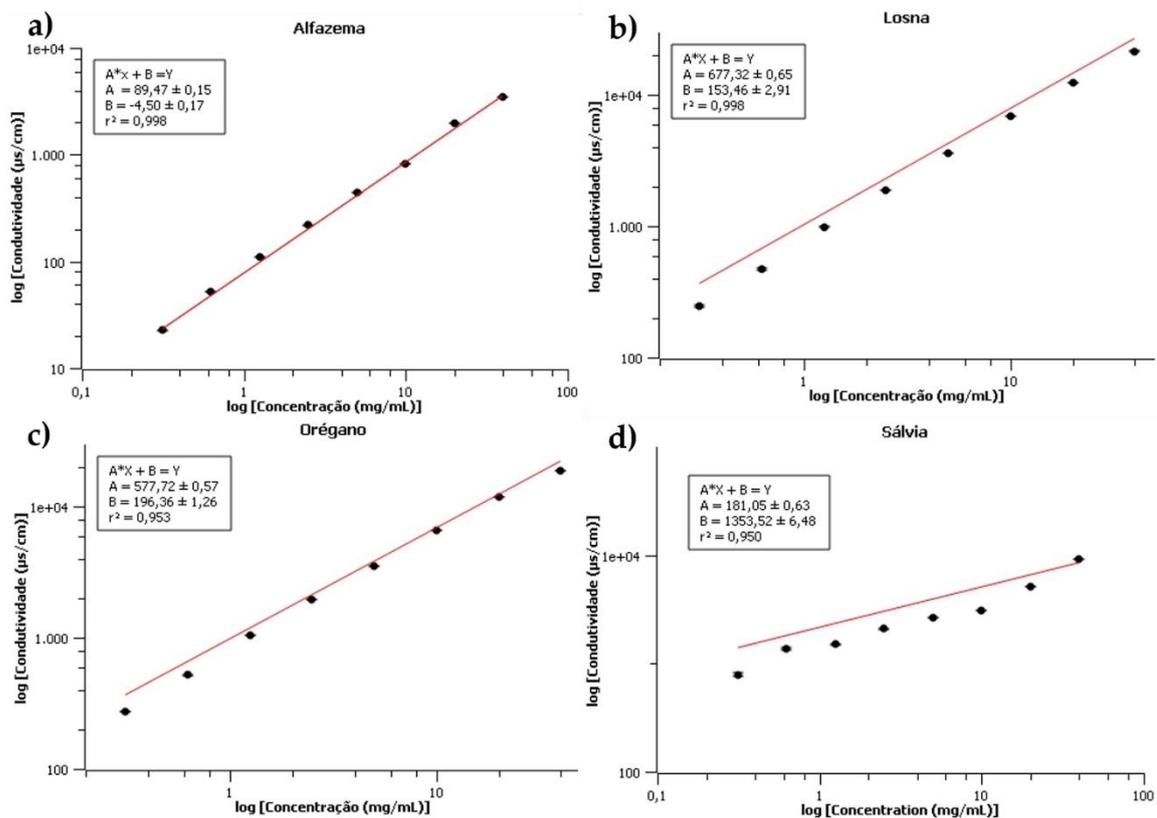
**Figura IV.4** – Detalhes de uma microplaca de 24 poços contendo extratos etanólicos/aquosos, LpC.sec.et e controles incubados com a levedura *S. cerevisiae* em meio YEPD sólido. Sendo no painel (a) aplicação dos controles da esquerda para direita: Anfotericina B (controle positivo), meio com levedura (controle negativo), meio com água e apenas meio. E no painel (b) aplicação das amostras sendo sempre, da esquerda para direita, LpV, extrato livre, LpC.sec.et coletado de 24 h e LpC.sec.et coletado de 48 h, e de cima para baixo as amostras: losna, alfazema, orégano e sálvia. A barra preta representa 1 cm.

### 4.3. Eficiência de encapsulamento (EE)

A literatura não fornece até o momento um método simples para calcular a EE de lipossomas que carreguem ativos formados por misturas complexas como extrato vegetal. A única alternativa disponível envolve a utilização de cromatografia (Bian, J. et al., 2022). Um método inventivo teve que ser desenvolvido aproveitando um sensor de condutividade elétrica (Cnd) para quantificar indiretamente EE. A Cnd mede a totalidade dos sólidos dissolvidos em uma amostra (Rhoades, J.D. 1996). Pesquisas destacam os fatores capazes de influenciar a Cnd, abrangendo as propriedades dos materiais, juntamente com a configuração e as dimensões dos sólidos dissolvidos (Kljusurić, J.G.; Benković, M.; Bauman, I. 2015). Assim, compreender a correlação existente entre o modelo proposto e o valor da Cnd experimental é fundamental para a precisão do método. Identificar uma correlação direta entre a concentração de um extrato e a condutividade elétrica para avaliar a EE representa um caminho praticamente inexplorado no domínio das aplicações da nanobiotecnologia.

A Figura IV.5 ilustra as correlações lineares obtidas entre sucessivas diluições dos extratos e a Cnd, com coeficiente de correlação maior que 0,95 observado para todos os extratos. Os LpV também passaram pelo processo de ultrafiltração para serem utilizados como controle.

Estudo anterior estabeleceu uma correlação entre a Cnd e a concentração de sais e matéria orgânica em solução (Rhoades, J.D. 1996). Essa correlação também foi evidente na presente Tese tendo em vista a correlação linear observada entre as diluições dos extratos em água em diferentes concentrações. As variações nas leituras (réplicas) para o extrato de alfazema foi  $\leq 1,5\%$ , para o extrato de losna foi  $\leq 3,4\%$ , para o extrato de orégano foi  $\leq 3,4\%$  e para o extrato de sálvia foi  $\leq 3,1\%$ . Esses resultados indicam que o método fornece precisão satisfatória ao correlacionar a Cnd com a concentração do extrato utilizado.



**Figura IV.5** – Curvas de calibração da correlação entre a concentração de cada extrato etanólico/aquoso (mg/mL) e a Cnd correspondente (em  $\mu\text{s/cm}$ ) para (a) alfazema, (b) losna, (c) orégano e (d) sálvia. A linha vermelha demonstra a linearidade dos dados, juntamente com a equação indicada em cada gráfico e o  $r^2$  correspondente.

A quantificação da EE, uma etapa fundamental na utilização de nanossistemas para o transporte de princípios ativos, foi obtida por meio de uma engenhosa abordagem baseada no uso de biossensor de Cnd. Essa estratégia aproveitou os dados abrangentes derivados das amostras de lipossomas contendo extratos (LpC.sec.et), perfeitamente integradas às fórmulas elucidadas anteriormente das curvas padrão. Com a concentração inicial estipulada em 40 mg/mL, essa informação fundamental foi a base para os cálculos. A partir desta base, a concentração de extrato que estava fora dos lipossomas foi determinada com precisão, interpolando-se na curva de calibração para cada extrato. Conseqüentemente, isto possibilitou o cálculo da porcentagem de extrato que permaneceu fora dos lipossomas, revelando uma estratégia incisiva de quantificação indireta guiada por biossensor, conforme meticulosamente delineado na Tabela IV.2. A EE, um fator crucial para a aplicação prática de lipossomas, foi determinada incorporando os valores de Cnd dos ultrafiltrados dos LpC.sec.et, que foram

obtidos para cada extrato, em suas respectivas fórmulas. Assim, esta abordagem permitiu a quantificação indireta do aprisionamento de cada extrato dentro dos lipossomas.

**Tabela IV.2** – Análise da condutividade elétrica de extratos e extrato presente em lipossomas ultrafiltrados. Comparação entre a condutividade elétrica esperada se os extratos se encontrarem 100% fora dos lipossomas e a condutividade dos extratos remanescente nos ultrafiltrados de cada LpC-sec.et.

Amostras	Cnd se extrato estiver 100% fora do Lp ( $\mu\text{s/cm}$ )	Cnd encontrada nos LpC.sec.et ( $\mu\text{s/cm}$ )
Alfazema	$3499,55 \pm 14,31$	$1558,25 \pm 13,21$
Losna	$21609,75 \pm 243,25$	$1688,52 \pm 32,83$
Orégano	$18822,80 \pm 29,14$	$2113,97 \pm 38,48$
Sálvia	$9222,80 \pm 28,67$	$8554,18 \pm 139,85$

Média aritmética e desvio padrão dos valores médios adquiridos a partir de três leituras de condutividade elétrica. Os valores já foram ajustados subtraindo a condutividade elétrica da água e o lipossoma vazio para os valores do ultrafiltrado.

No caso da amostra de alfazema, a análise da EE revelou a presença de  $17,47 \pm 0,15$  mg/mL equivalente de extrato fora dos lipossomas, constituindo  $43,67 \pm 0,37\%$  da concentração inicial. Para losna, uma análise correspondente indicou  $2,27 \pm 0,05$  mg/mL do extrato existente fora dos lipossomas, equivalendo a  $5,67 \pm 0,12\%$  da concentração inicial. Quanto ao orégano,  $3,32 \pm 0,07$  mg/mL do extrato permaneceram de fora, denotando  $8,30 \pm 0,17\%$  da concentração inicial. Por fim, a sálvia exibiu  $39,77 \pm 0,77$  mg/mL de extrato remanescente do lado de fora, abrangendo  $99,43 \pm 1,93\%$  da concentração inicial. Essas descobertas ressaltam a dinâmica de encapsulamento variada inerente a diferentes extratos vegetais. Enquanto extratos como losna e orégano apresentaram encapsulamento pronunciado, o extrato de sálvia exibiu um comportamento marcadamente divergente, com a maior parte de seus constituintes ativos permanecendo fora dos lipossomas.

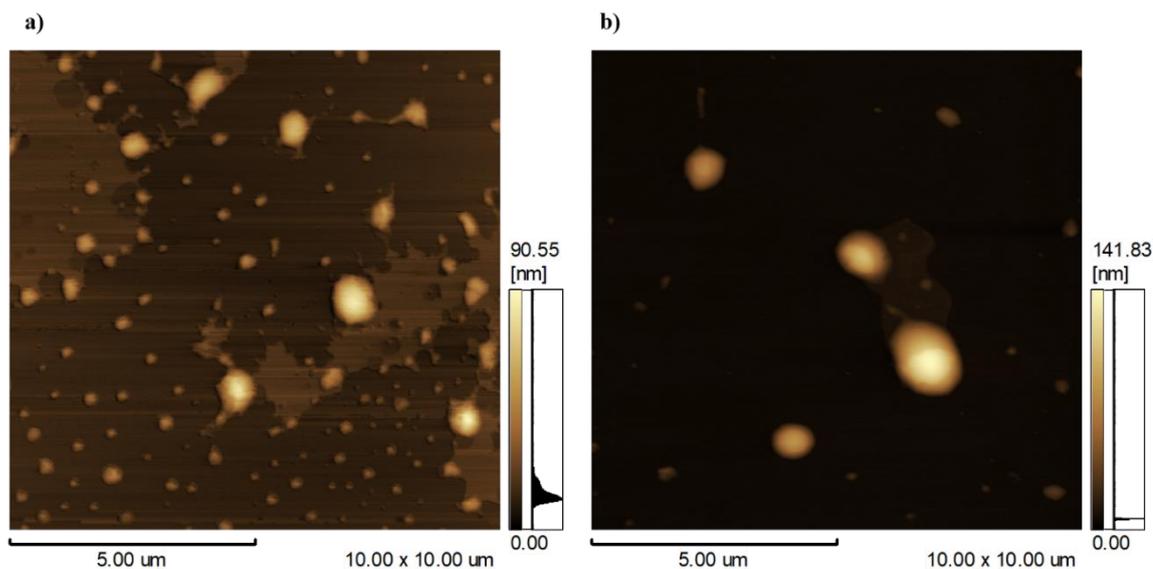
Os lipossomas produzidos com extrato de losna mesmo com uma EE elevada (cerca de 97%), não apresentaram nenhuma atividade biológica, indicando que os fosfolipídeos oferecem uma boa nanoestruturação e carreamento, entretanto, o extrato não atua contra *E. coli*, *S. aureus* ou *S. cerevisiae*. Já os lipossomas produzidos com extrato de orégano apresentaram alta EE (cerca de 91%) e demonstraram atividades bactericida e fungicida. Por outro lado, os lipossomas produzidos com extrato de alfazema revelaram EE intermediária (cerca de 56%), mas exibiram atividades bactericida e fungicida. Assim, os nanossistemas de orégano e alfazema foram os mais promissores, sendo o primeiro mais adequado para carreamento. Por fim os lipossomas produzidos com extrato de sálvia tiveram EE extremamente baixa (cerca de

0,5%), mas apresentaram atividade bactericida, indicando que o carregamento desse lipossoma não é satisfatório, mas seu extrato pode ser utilizado em aplicações biológicas.

#### 4.4. Microscopia de Força Atômica (MFA)

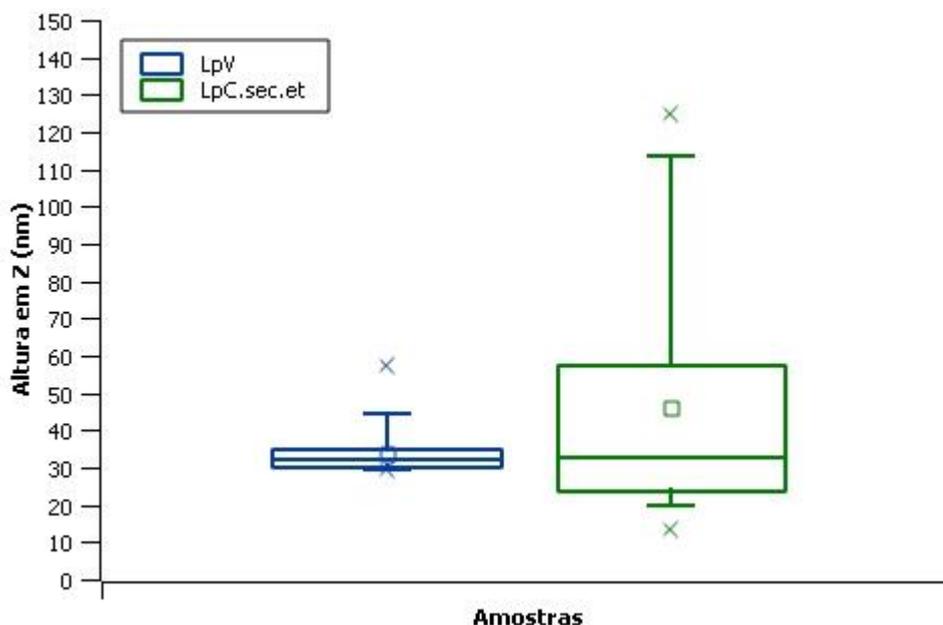
Como visto nas seções anteriores, a única nanoformulação lipossomal que apresentou atividade contra *S. aureus*, não diminuiu a viabilidade de células eucarióticas de mamífero, teve atividade leveduricida e apresentou alta EE foi o LpC.sec.et de orégano. Então, as próximas etapas da Tese foram conduzidas apenas com as amostras de orégano (extrato e lipossomas). O DH obtido por DLS indicou que para os LpV de orégano haviam duas subpopulações de tamanhos distintos, enquanto que para LpC de orégano havia apenas uma única população com maior DH médio, compatível com a subpopulação maior de LpV. Esse achado foi compatível com os visualizados por MFA, indicados na Figura IV.6. Esse resultado também corrobora com o PdI destas amostras, demonstrando que o LpV tinha uma maior heterogeneidade na amostra ( $0,686 \pm 0,104$ ), estatisticamente diferente do observado em LpC ( $0,488 \pm 0,056$ ).

Após obtenção de imagens por MFA, cerca de 100 lipossomas (LpV e LpC.sec.et) de orégano foram medidos com o auxílio do *software* SPM 9600, função *particle analysis*, e assim a altura (Z) em nm foi obtida para cada nanoestrutura individual. A média aritmética das alturas de LpV foi de 33,90 nm e a mediana 32,01 nm. Já para a amostra LpC.sec.et a média aritmética foi de 46,11 nm e a mediana de 32,88 nm, como demonstram os gráficos de caixa da Figura IV.7.



**Figura IV.6** – Imagens representativas de altura (topografia) obtidas por microscopia de força atômica em modo dinâmico dos LpV e LpC produzidos com fosfolípídeos extraídos de orégano. As imagens

foram adquiridas com resolução de  $512 \times 512$  linhas e taxa de varredura de 1 Hz. A) Imagens mostrando LpV com diferentes tamanhos e b) Imagens mostrando LpC.sec.et.



**Figura IV.7** – *Box plot* das alturas em Z em nanômetros medidos no *software* SPM 9600 com auxílio do módulo de análise de partículas (*particle analysis*). Foram medidos cerca de 100 lipossomas para cada amostra com base nas imagens obtidas. LpV (lipossomas contendo água tipo I); LpC.sec.et (lipossomas contendo extrato etanólico/aquoso de orégano).

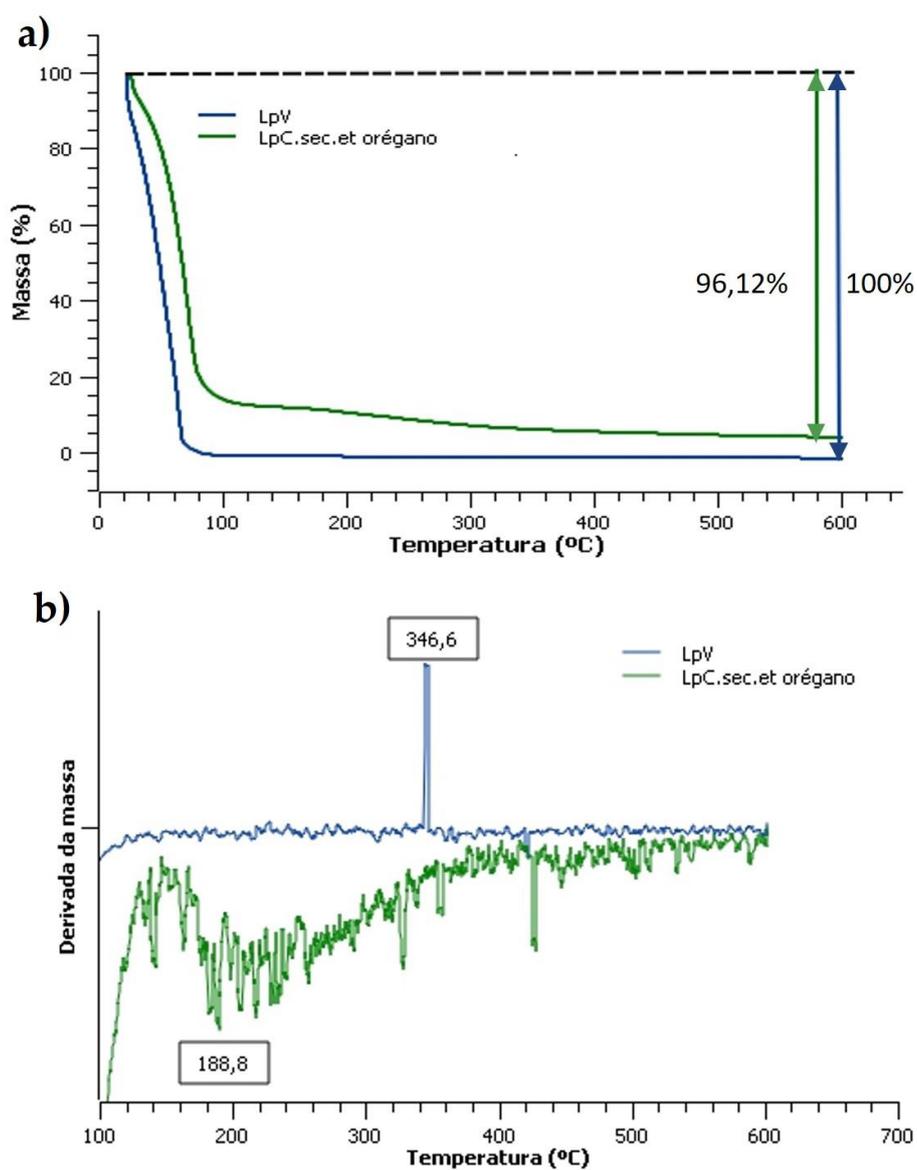
As alturas medidas por meio de MFA foram bem menores do que as indicadas pelo espalhamento de luz dinâmico. Este fato bastante conhecido deve-se ao fenômeno do lipossoma ser uma vesícula maleável e se depositar como uma gota sobre uma superfície plana (Jass, J., Tjarnhage, T., Puu, G., 2000; Tokumasu, F. et al., 2003). Então, realmente espera-se uma altura menor. Porém, ao contrário de todos os dados obtidos anteriormente, a dispersão da amostra no gráfico *box plot* foi maior no LpC.sec.et do que no LpV. Isso pode ter ocorrido, pois ao avaliar as imagens a quantidade de lipossomas com menores dimensões é bastante maior do que os de maiores dimensões (alturas), deslocando essa média e mediana para baixo, sendo que este efeito pode ser também associado à etapa de secagem das amostras necessária para as análises.

A partir desses resultados pode-se observar que o encapsulamento do extrato de orégano nos LpC.sec.et modulou várias características estruturais do nanossistema, inclusive o tamanho em altura. As vesículas apresentavam formas concêntricas compatíveis com demais formações já visualizadas na literatura (Vouselen, D. et al., 2020) e no capítulo II desta Tese.

#### 4.5. Análise termogravimétrica

As massas dos compostos que são analisados por termogravimetria sofrem alterações com o aumento da temperatura. Essas alterações são atribuídas a vários eventos térmicos, como evaporação de água e voláteis, fusão, sublimação e decomposição de compostos (Gabbot, P. 2008). As curvas termogravimétricas (TG) e curvas termogravimétricas derivadas (DTG) estão demonstradas na Figura IV.8.

Pode-se perceber na curva de TG (Figura IV.8a) que, para ambas as amostras, a maior perda de massa aconteceu até 100°C, visto que as amostras estavam líquidas. As perdas foram de 100% e 96,12% da massa até 600°C para LpV e LpC.sec.et de orégano, respectivamente. As curvas de DTG (Figura IV.8b) foram apresentadas apenas após 100°C, tendo em vista que até essa temperatura houve variação relevante, devido à perda de água. A literatura preconiza que as curvas podem ser distinguidas em três zonas principais de temperatura: a perda de umidade (até 150°C), a degradação de lipídeos (150 a 350°C) e a degradação de compostos encapsulados ou minerais (acima de 350°C) (Majdana, M. et al., 2010; Szcześ, A., Sternik, D. 2016). Pode-se perceber que a amostra de LpV apresentou apenas um pico após 100°C em 346,6°C, compatível com estudo anterior que demonstra a degradação de lectina de soja com um pico proeminente em 346,9°C (Antunes, N. 2020). Já quando analisados os LpC pode-se perceber uma série de picos e bandas que estão ligadas, provavelmente, à decomposição dos inúmeros compostos do extrato, como demonstrado em estudos anteriores de decomposição de flavonoides (Candela, R.G. et al., 2021). A linha abaulada entre 150 a 350°C também pode indicar uma transformação de fase conforme demonstrado em estudo anterior (Szcześ, A., Sternik, D. 2016). De todo modo, observou-se que o extrato interferiu, de forma expressiva na análise de DTG, não sendo possível inferir sobre os picos de degradação de lipídeos.

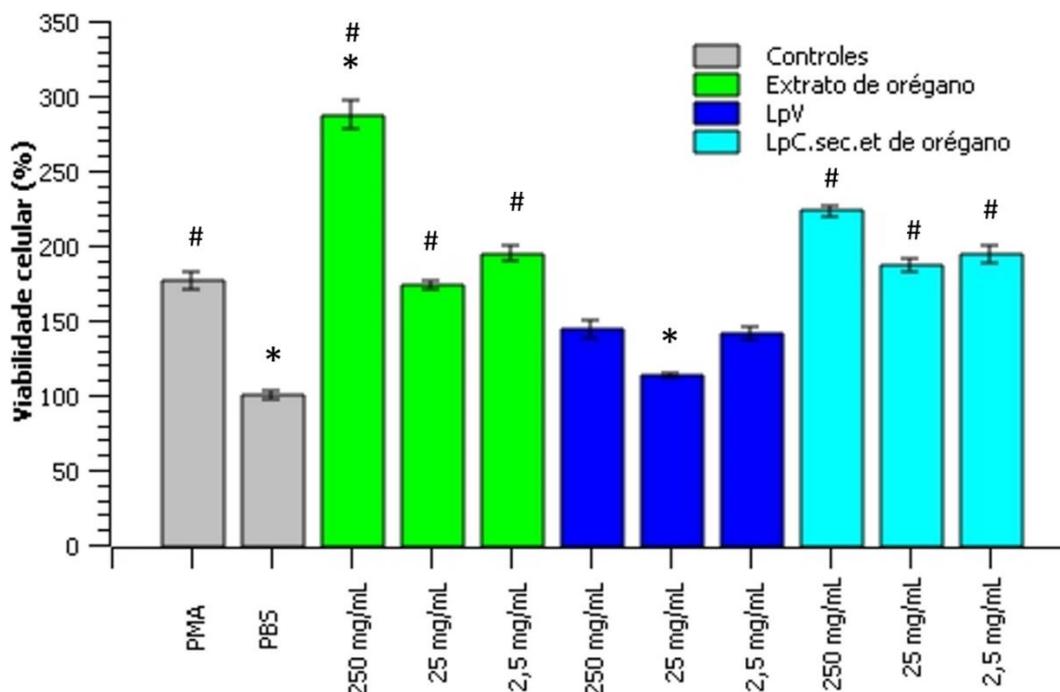


**Figura IV.8** – Análises térmicas de lipossomas vazios (LpV) e lipossomas cheios contendo extrato etanólico/aquoso de orégano (LpC.sec.et) até 600°C sob atmosfera de nitrogênio inerte. (a) Curvas de análise termogravimétrica, TGA e (b) Curvas de análise termogravimétrica derivada, DTG.

#### 4.6. Teste de viabilidade celular com sangue periférico bovino

Outra avaliação com células, agora sanguíneas, foi realizada, a fim de verificar em outro tipo celular os efeitos dos lipossomas sobre a viabilidade de células eucarióticas, utilizando 3 concentrações distintas. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura IV.9. Tanto os extratos, como os LpC que os continham demonstraram um aumento na viabilidade celular, todos diferentes estatisticamente do PBS ( $P < 0,05$ ), sendo que apenas o extrato na concentração

de 250 mg/mL demonstrou um aumento na viabilidade celular maior do que o PMA com taxa próxima a 287%. Quando comparados extrato livre e LpC, especialmente na concentração de 250 mg/mL, pode-se perceber que a nanoestruturação diminuiu a viabilidade celular em cerca de 64%. Outros estudos demonstraram que a nanoestruturação pode diminuir alguns efeitos do ativo livre, já que o ativo livre faz com que as células tenham uma maior absorção imediata do composto (Winter, E. et al., 2014), resultado que pode ter acontecido no presente estudo.



**Figura IV.9** – Viabilidade (%) de células de sangue periférico bovino na presença de extratos etanólicos/aquosos e seus lipossomas após 72 h de incubação. O método colorimétrico MTT foi utilizado para esta avaliação. A viabilidade celular é representada como PBS em 100% e PMA como controle positivo. \* Indica que a amostra foi estatisticamente diferente do PMA e # indica, também, que a amostra foi estatisticamente diferente do PBS ( $p < 0,05$ ).

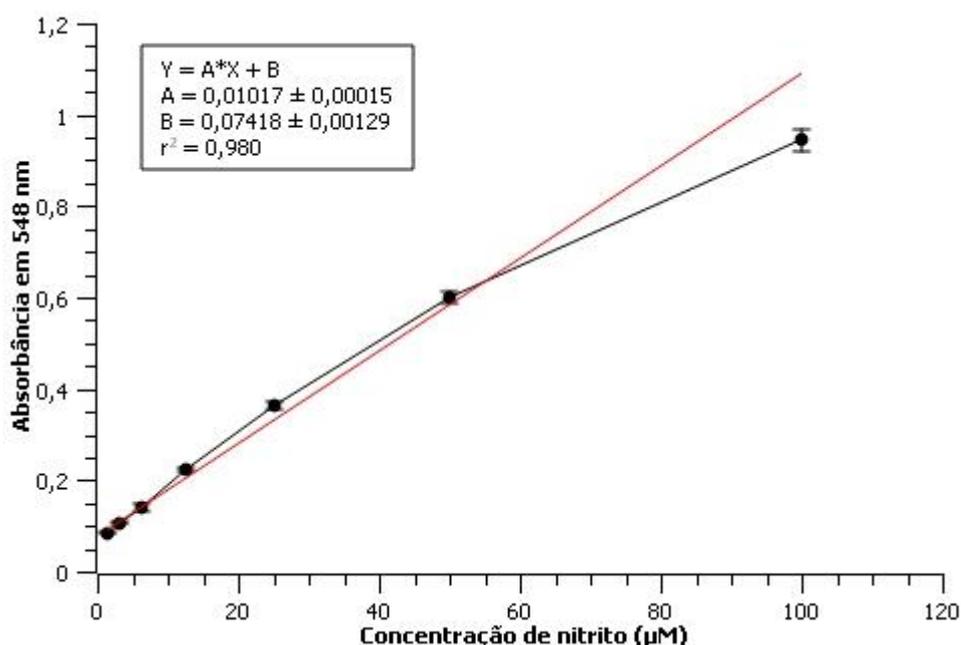
O PMA é um composto utilizado amplamente para diferenciação, que é caracterizada pelo aumento da viabilidade e proliferação celular (Hocevar, B.A. et al., 1992). No presente estudo, foi observado um aumento na viabilidade celular em 76% com o uso do PMA em relação ao tratamento com PBS, o que é esperado visto que estudos anteriores demonstram que células tratadas com PMA tendem a ter suas taxas de viabilidade elevadas em mais de 25% dependendo da linhagem celular (Sławińska-Brych, A. et al., 2021). Estudos prévios demonstraram que não havia um efeito significativo de nanoemulsões vazias, à base de lecitina de soja, sobre a taxa de viabilidade celular (Vater, C. et al., 2022), resultado que foi similar ao

observado nos LpV em todas as concentrações (250, 25 e 2,5 mg/mL), sendo que os resultados foram estatisticamente similares ao tratamento com PBS ( $P > 0,05$ ). Isso indica que os LpV com fosfolídeos extraídos da própria espécie são veículos de transporte inertes já que não alteram a resposta das células.

Já foi demonstrado anteriormente na presente Tese que extratos podem apresentar o efeito do aumento da viabilidade celular (Mapoung, S. et al., 2021) e isso novamente foi comprovado aqui. Também foi constatado que esse aumento da viabilidade celular é desejável nas aplicações tópicas, pois o aumento na atividade mitocondrial é essencial para o desenvolvimento de formulações para cicatrização de feridas (Thibane, V.S. et al., 2019).

#### **4.7. Quantificação de espécies reativas**

O óxido nítrico (NO), uma espécie reativa de nitrogênio, é um mediador molecular de muitos processos fisiológicos, incluindo formação de trombos, vasodilatação, inflamação e entre outros (Snyder, S.H. 1992). Uma das formas de se quantificar o NO é detectar espectrofotometricamente o nitrito formado pela oxidação espontânea do NO. Por meio da avaliação espectrofotométrica pode-se perceber que a absorbância é concentração dependente, conforme indicado na curva de calibração da Figura IV.10. A partir da equação indicada nessa figura pode-se inferir a concentração de NO nas suspensões celulares obtidas no ensaio anterior, com sangue periférico bovino. As concentrações de NO obtidas pela correlação da absorbância das amostras com essa equação são demonstradas na Figura IV.11.



**Figura IV.10** – Curva de calibração comparando concentração de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) e absorvância no comprimento de onda de 548 nm. O gráfico também apresenta a equação da reta e o  $r^2$ .

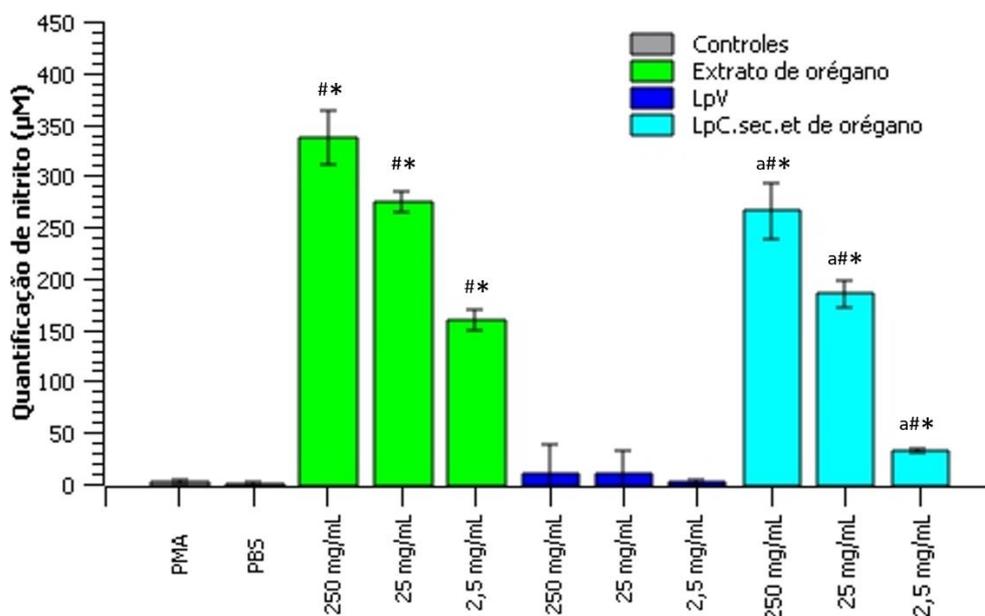
A utilização tanto do PMA, quanto dos LpV não aumentaram a produção de NO das amostras, sendo estatisticamente semelhante ao PBS, indicando mais uma vez que a utilização de fosfolipídeos extraídos do mesmo material botânico não interfere nas análises realizadas. Diferentemente, outro estudo demonstrou que células tratadas com o fosfolipídeo lectina de soja apresentaram um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (Mishra, A. et al., 2021).

Já quando analisados o extrato etanólico/aquoso de orégano (na concentração de 250 mg/mL) pode-se perceber um aumento em cerca de 565× na produção de NO quando comparado ao PBS. Essa produção de NO foi dose dependente, já que, ao diminuir a concentração de extrato, também houve a diminuição da produção de NO. Quando analisados os LpC percebe-se também um aumento na produção de NO, todavia, em uma proporção menor (cerca de 447× na concentração de 250 mg/mL). Quando comparados os LpC com os extratos livres, em cada concentração, todas foram estatisticamente diferentes, indicando que a nanoestruturação leva a uma menor produção de espécies reativas, ou seja, quando nanoestruturadas, a liberação do extrato pode ser menor levando à menor produção de espécies reativas. Outros artigos já demonstraram que diversas atividades de extratos podem ser

diminuídas com a nanoestruturação, indicando que a possível causa seja a liberação sustentada desses extratos (Manea, A-M., Vasile, B.S., Meghea, A. 2014; Istrati, D. et al., 2016).

Um fato importante que deve ser considerado é que o NO tem um papel de sinalização e regulação do crescimento, desenvolvimento e respostas de defesa das plantas (Flores, T. et al. 2008; Hong, J.K. et al. 2008). Também cabe destacar que pode haver uma produção endógena de NO nas plantas em resposta a estresses abióticos (Garcês, H., Durzan, D., Pedroso, M.C. 2001), invasão de patógenos (Delledonne, M. et al. 1998) e desafios com fungos (Foissner, I. et al. 2001), então pode ser que o NO endógeno dos extratos tenha interferido neste resultado.

As espécies reativas em locais de lesão de pele desempenham um papel fundamental para a resposta normal de cicatrização de feridas. Os elevados níveis de espécies reativas no local têm a capacidade de regular a formação de vasos sanguíneos (angiogênese) no local da ferida (Dunnill, C. et al., 2015). Entretanto, para que a presença de espécies reativas seja compatível com uma boa cicatrização, ela deve ser uma resposta local e permanecer em uma concentração não tóxica (Cooke, J et al., 2015). Então, estudos futuros devem ser realizados para testar clinicamente a eficácia desses extratos e nanossistemas.



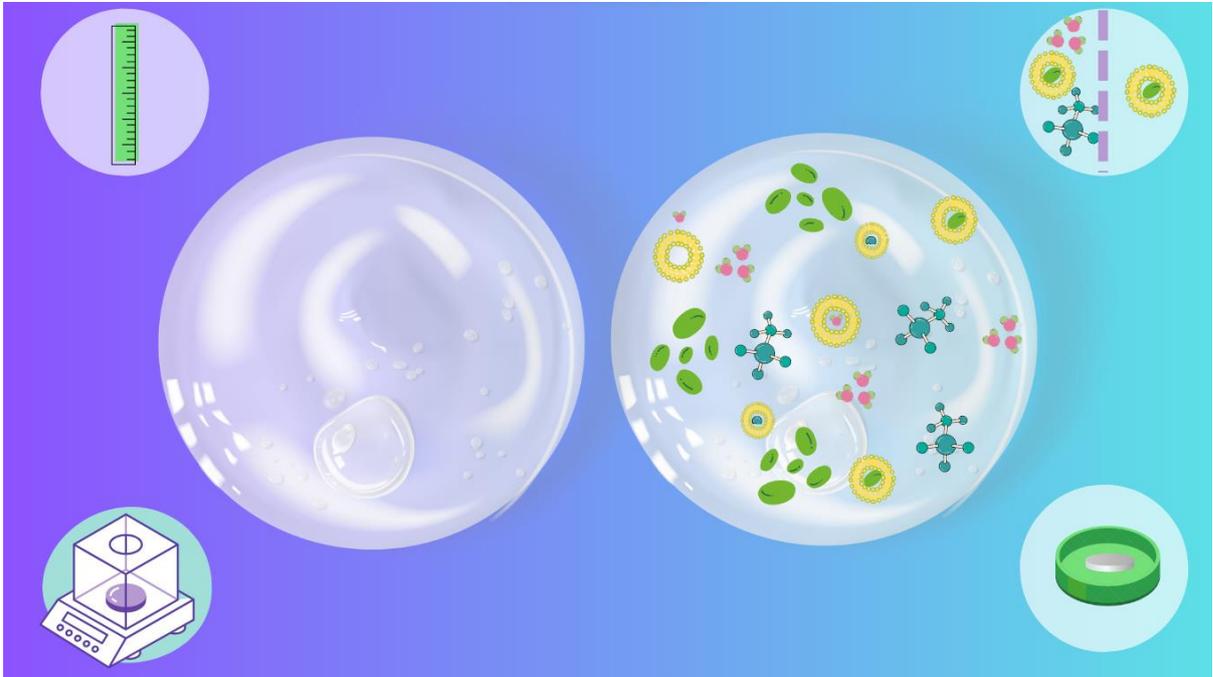
**Figura IV.11** – Quantificação de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) em suspensões de células sanguíneas periféricas incubadas com as amostras de extratos livres, lipossomas vazios (LpV) e lipossomas cheios contendo os extratos de orégano (LpC.sec.et) por 72 h em três concentrações distintas. PBS e PMA foram utilizados como controles.

## 5. CONCLUSÕES PARCIAIS

Com base nos dados obtidos foi possível, mais uma vez, realizar com sucesso a nanoestruturação de 8 nanossistemas (4 LpV e 4 LpC.sec.et) a partir de material botânico de alfazema, losna, orégano e sálvia. No ensaio em levedura *S. cerevisiae*, modelo de *C. albicans*, os LpC de alfazema e orégano demonstraram atividade fungistática, enquanto seus extratos livres não demonstraram tal efeito, sendo que desses, apenas orégano demonstrou atividade leveduricida. Dos LpC, as EE encontradas foram de 56,33%; 97,33%; 91,70%; e 0,57% nas espécies de alfazema, losna, orégano e sálvia, respectivamente. Assim, foi observada uma grande variação quanto à EE, algo considerado previsível no presente estudo, visto que, a extração de fosfolipídeos foram de espécies distintas e que os constituintes fitoquímicos dos extratos também são bastante distintos. A MFA demonstrou nanoformulação de vesículas concêntricas, esperadas na formação de lipossomas com altura média em nanoescala para os LpV (33,90 nm) e LpC (46,11 nm) de orégano e que os fosfolipídeos extraídos para formulação de lipossomas apresentam um pico de degradação próximo ao da lectina de soja. Também foi possível confirmar mais uma vez que extrato e LpC de orégano aumentam a viabilidade celular. Sendo assim foi possível caracterizar biologicamente e fisicoquimicamente os lipossomas produzidos, possibilitando a seleção daqueles que apresentaram atributos mais adequados à aplicação pretendida.

## CAPÍTULO V

### PRODUÇÃO DE HIDROGEL CONTENDO LIPOSSOMAS



**Figura V.1** – Resumo gráfico do Capítulo V, demonstrando um hidrogel vazio e um hidrogel contendo lipossomas e extratos vegetais. Ao redor são demonstradas etapas de caracterizações realizadas com os hidrogéis.

## Resumo

Hidrogéis são sistemas reticulados tridimensionais que já vem sendo estudados e até mesmo aplicados em curativos. Esse tipo de material quando utilizado em curativos oferece uma série de benefícios, sendo o principal deles fornecer um suporte mecânico para migração celular e regeneração dos tecidos. O objetivo do presente Capítulo V foi produzir e caracterizar hidrogéis a fim de incorporar LpC.sec.et de orégano para futuras aplicações tópicas. Foi possível obter uma concentração otimizada dos polímeros carboximetilcelulose (2,5%) e agarose (3%) para que o mesmo se mantivesse estruturado ao mesmo tempo em que permanecesse maleável, características desejáveis para a aplicação pretendida. O hidrogel também não teve alta taxa de intumescimento, ideal para aplicações tópicas. Contudo, percebeu-se que o tempo de retenção do hidrogel em modelo de pele artificial não é longo, necessitando assim de aprimoramento futuro caso seja necessário mais tempo de aderência na superfície. De todo modo, o hidrogel desenvolvido possibilitou a liberação dos conteúdos dos lipossomas através de uma membrana de diálise por mais de 72 h, com uma taxa de liberação total de  $k = -0,064$ , com uma maior taxa nas primeiras 24 h, confirmado por teste antimicrobiano. Assim, conseguiu-se produzir um hidrogel que além de estabilizar mais os lipossomas, tem potencial para realizar a entrega e liberação sustentada dos princípios ativos.

**Palavras-chave:** Carboximetilcelulose, agarose, taxa de liberação, atividade antimicrobiana.

## Abstract

Hydrogels are three-dimensional cross-linked systems that have already been studied and even applied in curative. This type of material, when used in curative, offers a series of benefits, the main of which is providing mechanical support for cell migration and tissue regeneration. The objective of this Chapter V is to produce and characterize hydrogels in order to incorporate oregano LpC.sec.et for future topical applications. It was possible to obtain an optimized concentration of the polymers carboxymethylcellulose (2.5%) and agarose (3%) so that it remained structured while remaining malleable, desirable characteristics for the intended application. The hydrogel also did not have a high swelling rate, ideal for topical applications. However, it was noticed that the retention time of the hydrogel in an artificial skin model is not long, thus requiring future improvement if longer adhesion time to the surface is required. In any case, the developed hydrogel enabled the release of liposome contents through a dialysis membrane for more than 72 h, with a total release rate of  $k = -0.064$ , with a higher rate in the first 24 h, confirmed by antimicrobial testing. Thus, it was possible to produce a hydrogel that, in addition to further stabilizing the liposomes, has the potential to perform the delivery and sustained release of the active ingredients.

**Keywords:** carboxymethylcellulose, agarose, delivery rate, antibiotic activity.

## 1. INTRODUÇÃO

A pele, o maior órgão do corpo humano, representa cerca de 10% do peso corporal, e constitui a barreira do corpo contra patógenos do meio ambiente, sendo formada por três camadas interconectadas (Eke, G. et al., 2017; Tchemtchoua, V.T. et al., 2011). Devido a esse alto contato externo, a pele é altamente suscetível a danos. Ao acontecer esses danos, um processo de cicatrização é iniciado. Os danos na pele podem ser agudos ou crônicos, sendo agudos quando se trata de um trauma acidental que podem demorar de dias até meses para o processo de cicatrização completa; e quando crônico, como aqueles resultantes de queimaduras, infecções, diabetes podem demorar muito tempo para ocorrer o processo de cicatrização, sendo assim um tratamento de longo prazo é necessário (Niculescu, A.G., Grumezescu, A.M. 2022).

Para curar feridas, vários tipos de curativos foram desenvolvidos desde gaze até mesmo nanofibras e hidrogéis (Kang, J.I., Park, K.M. 2021). Os hidrogéis são sistemas de rede reticulados em 3D compostos de polímeros com afinidade por água (Aljghami, M.E., Saboor, S., Amini-Nik, S. 2019). Os hidrogéis têm inúmeras vantagens ao serem aplicados na pele, visto que podem oferecer a hidratação necessária, são fáceis de trocar, são biocompatíveis, podem ser funcionalizados de várias maneiras para entregarem ativos necessários para melhor cicatrização, e por fim, e mais importante, podem simular a composição e as propriedades mecânicas dos tecidos naturais, fornecendo espaço suficiente e suporte mecânico para migração celular e regeneração de tecidos (Boateng, J.S. et al., 2008; Wang, J. et al., 2019).

Diversos biopolímeros podem ser empregados na elaboração de hidrogéis, como a agarose e a carboximetilcelulose. A agarose é um polissacarídeo linear e biocompatível extraído de algas marinhas, cujas propriedades mecânicas são semelhantes às de tecidos e que podem ser facilmente moduladas variando a concentração (Miguel. S.P. et al., 2014). Já a carboximetilcelulose é um biopolímero aniônico derivado da celulose, com propriedades como biocompatibilidade e biodegradabilidade, entretanto apresenta baixa resistência mecânica, necessitando comumente ser combinada com outros polímeros. A carboximetilcelulose também não apresenta atividade celular expressiva, podendo ser considerada biologicamente inerte (Li, Y. et al., 2019).

Para que um hidrogel seja funcionalizado e aplicado, este deve ter algumas características reológicas bem definidas. Nesse sentido, também é necessário verificar se o princípio ativo incorporado pode ser liberado da malha tridimensional de polímeros. Assim, o

propósito deste Capítulo V foi produzir e caracterizar hidrogéis que foram incorporados com lipossomas carreando extratos com atividades biológicas conhecidas.

## **2. OBJETIVOS**

- Selecionar a melhor concentração de polímeros para produção de hidrogéis;
- Avaliar as características reológicas dos hidrogéis produzidos por testes de intumescimento, ressecamento e fixação;
- Formular hidrogéis contendo lipossomas com atividade biológica anteriormente verificada;
- Avaliar as características biológicas dos hidrogéis produzidos;
- Avaliar a eficiência de liberação de lipossomas da malha polimérica do hidrogel.

### 3. METODOLOGIA

A metodologia utilizada no Capítulo V é apresentada na Figura V.2, conforme mencionado na apresentação da Tese. Informações mais detalhadas sobre os materiais e métodos estão disponíveis no Capítulo I.

#### Capítulo V



**Figura V.2** – Fluxograma da metodologia empregada no Capítulo V da presente Tese. Sendo os retângulos brancos etapas intermediárias e as formas de coloração amarela etapas de caracterização. As numerações em negrito abaixo de cada item do fluxograma indicam a numeração da seção na qual essa metodologia foi descrita no Capítulo I.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Produção e triagem do hidrogel

Foram produzidos 20 mL de cada hidrogel com as variações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5% de carboximetilcelulose e a mesma concentração de agarose (3%). Os hidrogéis foram armazenados a temperatura ambiente em uma forma de silicone com 5 cm<sup>2</sup> e após geleificação foram cortados em quadrados de cerca de 1 cm<sup>2</sup>, como mostrados na Figura V.3.



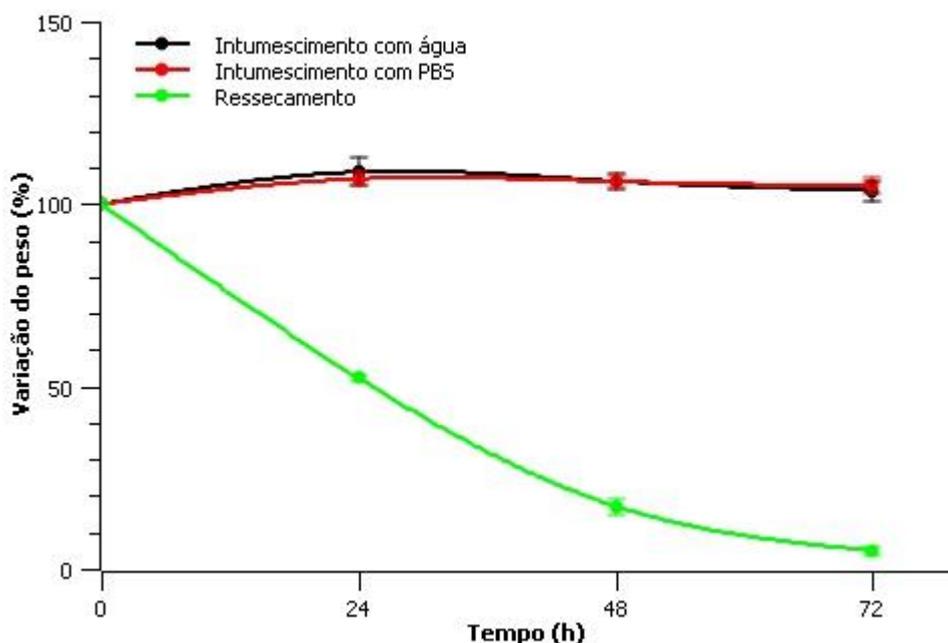
**Figura V.3** – Fragmentos de hidrogéis com porcentagem fixa de agarose (3%) e variações de carboximetilcelulose (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5%), sendo avaliados 3 fragmentos para cada concentração.

Com base nas características macroscópicas avaliadas, a porcentagem de carboximetilcelulose escolhida como mais adequada foi de 2,5% por conferir maior resistência mecânica ao gel. Com essa concentração, após o manuseio dos mesmos eles mantiveram sua forma e não quebraram. O uso de hidrogéis no tratamento de feridas tem sido cada vez mais explorado. Além de facilitar as trocas, “curativos” à base de hidrogéis podem oferecer diversas características adicionais como manter a hidratação da pele e inibir o crescimento de microrganismos oportunistas (Yaxuan, Y. et al., 2021). Já foi demonstrado que um hidrogel contendo agarose melhora a cicatrização, inclusive diminuindo a inflamação (Miguel, S.P. et al., 2014). Outro estudo demonstrou que um hidrogel de carboximetilcelulose e polilisina promoveu o reparo de feridas apresentando características reológicas estáveis e degradabilidade

efetiva (Wang, X. et al., 2021). A carboximetilcelulose é um polímero biocompatível e biodegradável, sendo que há um crescente número de trabalhos envolvendo esse composto na área biomédica que demonstram suas excelentes propriedades como biodegradação favorecida e custo baixo (Wang, S. et al., 2011; Boppana, R. et al., 2010).

#### 4.2. Teste de intumescimento PBS e água e teste de ressecamento

Com base nas observações da seção anterior, o hidrogel produzido a partir da combinação de 3% de agarose e 2,5% de carboximetilcelulose foi produzido e seccionado em quadrados com cerca de 1,5 cm<sup>2</sup> e adicionados em 10 mL de água ou PBS, ou foram deixados expostos ao ambiente. Com o peso de cada fragmento devidamente medido e a variação percentual do peso ao longo do intervalo de tempo (24 h) avaliado, foram obtidos os resultados apresentados na Figura V.4.



**Figura V.4** – Curvas cinéticas da avaliação reológica de hidrogel de agarose (3%) e carboximetilcelulose (2,5%) por meio do teste de intumescimento em água e PBS, e teste de ressecamento, sendo cada teste realizado em triplicata.

Pode-se perceber nos testes de intumescimento, seja com água ou PBS que o ganho de peso do hidrogel aconteceu apenas nas primeiras 24 horas, sendo que nos demais intervalos de tempo avaliados o hidrogel progressivamente perdeu esse peso, entretanto não retornou ao peso

inicial. Já no teste de ressecamento pode-se perceber que com 24 h houve perda de cerca de 50% do seu peso, prolongando até o final das 72 h de avaliação.

Estudo recente demonstrou que um hidrogel para aplicações tópicas não pode ter taxa de intumescimento alta, pois se um hidrogel apresenta taxa de intumescimento elevada demonstra que as ligações tridimensionais do hidrogel não estão muito estáveis e podem se degradar facilmente (Huan, H. et al., 2023). Um estudo recente sugeriu que uma taxa de intumescimento de 313,7% de um hidrogel ainda seria considerada baixa (Lan, G. et al., 2021). Na presente Tese, nas primeiras 24 h foi observada uma taxa de no máximo  $108,8 \pm 3,7\%$  com água tipo I e de  $106,9 \pm 1,9\%$  com PBS, o que é considerada extremamente baixa conforme a literatura. Na Figura V.5 pode-se visualizar a comparação de uma secção do hidrogel que apresentou intumescimento em água ( $5,01 \text{ cm}^2$ ) comparada a uma secção do hidrogel que foi exposta ao teste de ressecamento ( $0,76 \text{ cm}^2$ ) após 72 h. Ambas eram secções com área aproximada de  $1,5 \text{ cm}^2$  no início das avaliações. A área medida ao final dos testes representa uma variação de 84,83% (perda na amostra ressecada).



**Figura V.5** – Secção de hidrogel de agarose (3%) e carboximetilcelulose (2,5%) submetida ao teste de intumescimento em água (esquerda) quando comparada a secção de mesma área inicial submetida ao teste do ressecamento. Imagem obtida após 72 h de avaliação.

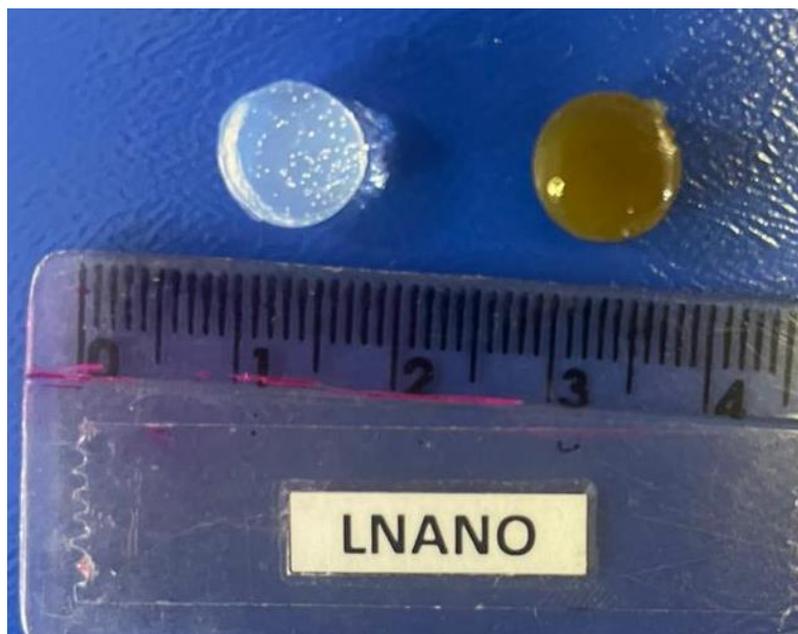
#### 4.3. Teste de fixação

Secções do hidrogel selecionado, sem passar pelo processo de hidratação (intumescimento), foram aderidas por 30 segundos em pele artificial e em polietileno e, em seguida, invertidas 180°. A secção de hidrogel se manteve fixada por 20 min e 21 segundos em pele artificial e já em polietileno ficou fixada por 30 h e 34 min. Para possíveis aplicações em

pele pode-se perceber que será necessária uma complexação do hidrogel com algum outro componente que possa aumentar a capacidade adesiva dos mesmos e pele. Uma das opções para aumentar a aderência em superfícies como a pele seria adicionar agrupamentos químicos que estabeleçam ligações que possam favorecer a estabilidade com a pele, como ligações oximas (Li, Z., Liu, L., Chen, Y. 2020).

#### **4.4. Teste de halo de inibição**

O teste de halo de inibição foi realizado com o hidrogel associado com lipossomas vazios (LpV orégano) e cheios de extrato etanólico/aquoso (LpC.sec.et orégano) incorporados. Também foi utilizado hidrogel associado com antibióticos para ser controle positivo; hidrogel sem adição de outros componentes e hidrogel contendo lipossoma vazio. Os hidrogéis foram produzidos com 500  $\mu\text{L}$  de conteúdo aquoso (como demonstra a Figura V.6), sendo sempre 450  $\mu\text{L}$  de água tipo I e 50  $\mu\text{L}$  do conteúdo que ele veicula. Portanto, partindo da concentração inicial de extrato de 2500 mg/mL, cada hidrogel apresentou o equivalente a uma concentração final de 250 mg/mL de extrato de orégano (ou componentes correspondentes), a mesma aplicada nos testes MIC dos Capítulos anteriores. Foi realizado um teste preliminar que demonstrou que nem hidrogel contendo o LpV, nem apenas o hidrogel controle (sem incorporação de lipossomas) demonstravam atividade contra as bactérias testadas, como mostrado na Figura V.7.



**Figura V.6** – Exemplo representativos dos hidrogéis de agarose (3%) e carboximetilcelulose (2,5%) produzidos para o teste do halo de inibição, sendo o hidrogel da esquerda contendo os antibióticos penicilina e estreptomicina e o hidrogel da direita contendo LpC.sec.et de orégano.



**Figura V.7** – Fotografia representativa de placa de Petri após 72 h da inoculação de *S. aureus* e exposição a hidrogéis. Hidrogel superior contendo antibiótico, inferior esquerdo contendo LpV e inferior direito apenas com água. Barra preta representa 1 cm.

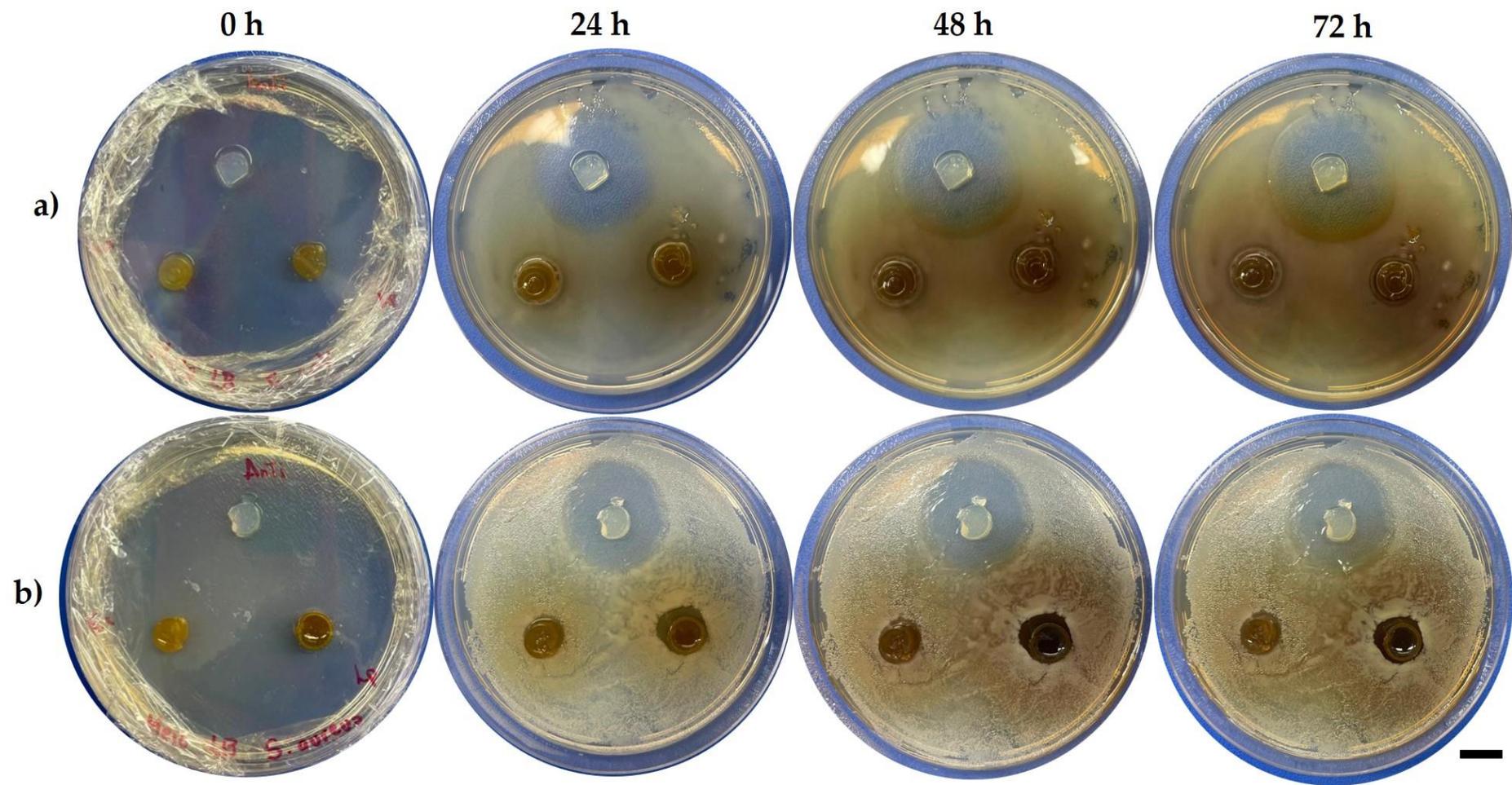
Com auxílio do *software* ImageJ, foram obtidas 4 medidas do halo formado nos tempos de 24, 48 e 72 h, como apresentado na Figura V.8 e os resultados estão demonstrados na Tabela V.1.

**Tabela V.1** – Halo de inibição formado pelos hidrogéis contendo antibiótico (Anti), extrato de orégano (Ext) e LpC.sec.et de orégano (LpC) de nos tempos de 24, 48 e 72 h

Bactéria	Hidrogel contendo	Tamanho do halo (mm)		
		24 h	48 h	72 h
<i>E. coli</i>	Anti	9,7 ± 1,8	10,3 ± 1,2	13,0 ± 1,2
<i>E. coli</i>	Ext	∅	∅	∅
<i>E. coli</i>	LpC	∅	∅	∅
<i>S. aureus</i>	Anti	9,0 ± 1,5	9,3 ± 2,1	9,4 ± 1,8
<i>S. aureus</i>	Ext	∅	∅	∅
<i>S. aureus</i>	LpC	2,2 ± 1,1	2,3 ± 1,5	2,3 ± 0,8

∅ indica que não houve a formação de halo de inibição.

Diferentemente dos testes de MIC em meio líquido conduzidos nos capítulos anteriores, aqui apenas os hidrogéis contendo LpC tiveram ação sobre o microrganismo *S. aureus*, demonstrando que os LpC apresentaram facilidade para desprender ou liberar seus conteúdos (extrato etanólico/aquoso) da matriz polimérica e atuar sobre os microrganismos, diferente do extrato livres. Nos hidrogéis contendo lipossomas ou extrato consegue-se perceber um halo de difusão do extrato no meio. Estudos demonstraram que hidrogéis tem a capacidade de manter ou proteger o que nele contido (Moneris, M. et al., 2019), então além do resultado positivo pode-se perceber que houve entrega sustentada desse princípio ativo, liberação essa que será calculada no próximo tópico.



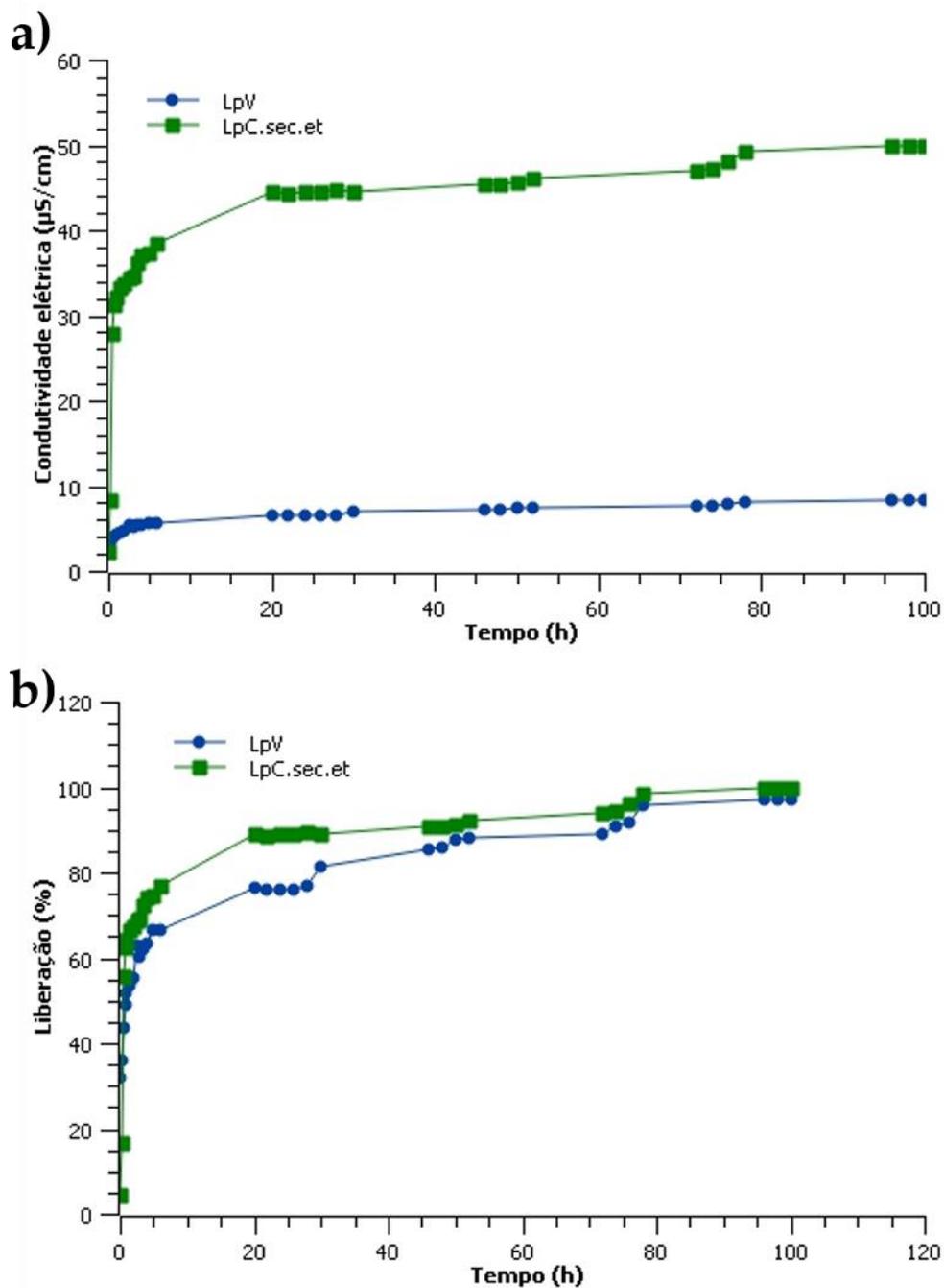
**Figura V.8** – Fotografias de placas de Petri em variados intervalos de tempo após inoculação. a) Inoculação com *E. coli*; b) inoculação com *S. aureus*. Hidrogel superior contendo antibiótico, inferior esquerdo contendo extrato etanólico/aquoso de orégano e inferior direito contendo LpC.sec.et de orégano. Barra preta representa 1 cm.

#### 4.5. Teste de liberação e determinação da constante k

O experimento para avaliação da liberação dos lipossomas e os componentes do extrato de orégano dos hidrogéis foi realizado adicionando 500  $\mu$ L de hidrogel contendo LpV ou LpC.sec.et de orégano com 1 mL de água tipo I em uma membrana de diálise clipada submersa em 40 mL de água tipo I, como demonstrado na Figura V.9. Os dados de Cnd foram medidos na água tipo I que estava do lado de fora da membrana após variados intervalos de tempo (Figura V.10a). Entretanto, para comparar o perfil de liberação de várias formulações durante o experimento, os dados foram previamente normalizados para 100% de liberação em 98 e 100 h, quando já não havia mais alteração da Cnd, como demonstra a Figura V.10b. Isso permite a comparação de formulações com diferentes conteúdos seja livre ou nanoestruturado. Após a normalização, o seguinte modelo foi utilizado para ajustar os dados experimentais utilizando regressão não linear.



**Figura V. 9** – Hidrogéis dentro de membranas de diálise de 12 a 14 kDa, sendo a da esquerda com hidrogel contendo LpV e a da direita contendo LpC.sec.et de orégano.



**Figura V.10** – Perfil de difusão dos componentes através de membranas de diálise de 12-14 kDa de lipossoma vazio (LpV) ou de lipossoma contendo extrato etanólico/aquoso de orégano (LpC.sec.et). a) Demonstração do perfil de Cnd; b) Dados relativos normalizados para liberação de 100% dos lipossomas em 96 h.

Com base nas curvas obtidas foi calculada a contante de liberação ( $k$ ) de acordo com fórmula no tempo de 96 h e  $k = -0,064735501$ . Pode-se então ser calculados T99, T90, T50, T20 e T10 que são os tempos necessários para liberar 99%, 90%, 50%, 20% e 10% do conteúdo

dos lipossomas, respectivamente.  $T_{99} = 71$  h,  $T_{90} = 35$  h,  $T_{50} = 10$  h,  $T_{20} = 3,4$  h e  $T_{10} = 1,6$  h. Durante o teste de liberação, as amostras liberaram rapidamente a maioria do conteúdo dos lipossomas (>50% em 10 horas). A liberação global do extrato observada é, portanto, resultado de dois processos paralelos de transporte de massa: (1) a “verdadeira” liberação do extrato a partir dos lipossomas; e (2) a difusão do extrato liberado através da membrana de diálise. Pode haver conteúdos pequenos que possam passar através da membrana, o que são raros, visto que os conteúdos de extratos formam normalmente enovelados grandes (Xu, X. Khan, M.A., Burgess, D.J. 2012). Por mais que haja liberação rápida dos extratos, percebeu-se um aumento de liberação até 96 h.

## 5. CONCLUSÕES PARCIAIS

Com base nos resultados obtidos pode-se perceber que foi possível obter um hidrogel de agarose (3%) e carboximetilcelulose (2,5%) que manteve seu formato mesmo após manuseio; que apresentou taxa de intumescimento baixa, importante quando se trata de aplicações tópicas; e que possibilitou a incorporação de lipossomas com atividades antibacteriana contra *S. aureus* por até 72 h. É necessário melhorar a bioadesividade do protótipo de hidrogel desenvolvido, possivelmente estruturando uma bandagem com outros polímeros. Também conseguiu-se determinar a taxa de liberação do conteúdo do lipossoma contendo extrato etanólico/aquoso de orégano do hidrogel em água em uma taxa de  $k = -0,0647$ , sendo o  $T_{10} = 1,6$  h,  $T_{20} = 3,4$  h,  $T_{50} = 10$  h,  $T_{90} = 35$  h e  $T_{99} = 71$  h. Assim, conseguiu-se produzir um hidrogel que além de estabilizar mais os lipossomas, tem potencial para realizar a entrega e liberação sustentada dos princípios ativos presentes no extrato.

## 6. CONCLUSÕES / CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir de metodologia adaptada de patente depositada foi possível extrair fosfolipídeos de folhas e caules de 20 espécies vegetais, e perceber que 17 delas possibilitaram a nanoestruturação de lipossomas, sendo seu, conteúdo, água (LpV) ou extrato (LpC). Uma vantagem percebida no presente método é a não necessidade de extrusão por membrana para obtenção de nanossistemas, tornando a produção de lipossomas menos onerosa e mais sustentável. Em LpV foram confirmados por espectroscopia Raman picos e bandas referentes à formação de lipossomas. Lipossomas carregando extratos etanólicos/aquosos (LpC.sec.et) de alfazema e orégano na concentração de 250 mg/mL revelaram potencial antibacteriano e antioxidante, preservando a viabilidade de células eucarióticas de mamíferos. No ensaio com levedura *S. cerevisiae*, modelo para fungos patogênicos de humanos como *C. albicans*, os LpC.sec.et de alfazema e orégano demonstraram atividade fungistática, enquanto os extratos livres correspondentes não demonstraram, sendo que desses, apenas orégano demonstrou atividade fungicida. Dos LpC.sec.et produzidos, as EE obtidas foram bastante variadas conforme a fonte do material botânico, com 56,33% e 91,70% para as espécies de alfazema e orégano, respectivamente. Por MFA foi possível comprovar a presença de estruturas concêntricas compatíveis em topografia com a formação de lipossomas, e por TGA foi possível averiguar um pico de degradação de lipídeos compatível com lectina de soja. Para conferir uma maior estabilidade e entrega sustentada dos lipossomas e seu conteúdo foi formulado um hidrogel com 3% de agarose e 2,5% de carboximetilcelulose que conferiu maior resistência e estabilidade, apresentou taxa de intumescimento baixa, atributo desejável para aplicações tópicas. A formulação de lipossomas incorporados em hidrogel ainda apresentou atividade inibitória contra *S. aureus*. Em teste de liberação em membrana de diálise foi constatar que o tempo necessário para o hidrogel liberar 90% do conteúdo lipossomal foi de 35 h. Em síntese, foi possível a formulação de um nanossistema lipossomal 100% de origem vegetal com atividade antimicrobiana (bactéria Gram-positiva e levedura), atividade antioxidante e sem efeitos negativos em células eucarióticas de mamíferos o qual pode ser incorporado a hidrogel biopolimérico permitindo a liberação sustentada dos componentes fitoquímicos bioativos. As perspectivas dessa Tese apontam para realização de testes em culturas de células epiteliais e avaliações *in vivo*. Esses testes representam um passo crucial para futura aplicação tópica desses hidrogéis contendo lipossomas vegetais, tanto em animais quanto em seres humanos.

## 7. CRONOGRAMA FINAL

Atividades	2019		2020		2021		2022		2023	
	1ºsem	2ºsem								
Revisão da literatura	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Cursar disciplinas	•	•	•	•	•					
Participação em eventos		•		•	•	•	•		•	
Prospectar plantas medicinais	•	•								
Extração de princípios ativos	•	•								
Extração de fosfolídeos	•	•								
Produção de lipossomas			•							
Caracterização de lipossomas			•							
Teste <i>in vitro</i> de atividade antibacteriana			•			•		•		
Teste <i>in vitro</i> de atividade antifúngica							•	•		
Teste <i>in vitro</i> de atividade antioxidante									•	
Formulação do hidrogel									•	
Caracterização do hidrogel							•			
Associação lipossomo - hidrogel									•	
Teste <i>in vitro</i> de viabilidade celular								•		
Publicação de artigos										•
Exame de qualificação				•						
Defesa da tese										•

O cronograma demonstra todas atividades realizadas (•), sendo que foi adicionado mais um período de tempo no cronograma (1º e 2º sem de 2023), pois a bolsa CAPES foi prorrogada por mais 9 meses em função da pandemia de SARS-CoV-2.

## 8. LISTA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA

### 8.1. Capítulos de livro

- Silva, L.P., Bonatto, C.C., Carvalho, B.S., Pupe, J. M., **Pereira, T. M.**, Araujo, T.F. Síntese Verde de Nanomateriais. In: Graziella Anselmo Joanitti; Paulo César de Moraes; Ricardo Bentes de Azevedo. (Org.). Nanotecnologia: considerações em materiais, saúde e meio ambiente. 1ed. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2022, v. 1, p. 1-51.
- Silva, L.P., Silvera, A.P., Bonatto, C.C., Barbosa, E.F., Medeiros, K.A., Viol, L.C.S., **Pereira, T.M.**, Santiago, T.R., Polez, V.L.P., Lauria, V.B.M. Capítulo 12: Sustainable Exploitation of Agricultural, Forestry, and Food Residues for Green Nanotechnology Applications. In: Devarajan Thangadurai; Saher Islam; Jeyabalan Sangeetha; Natália Martins. Biogenic Nanomaterials Structural Properties and Functional Applications. 1ed: 2021, v.1, p. 1-392.
- Silva, L. P., **Pereira, T.M.**, Bonatto, C.C. Frontiers and perspectives in green synthesis of silver nanoparticles. In: Ashutosh Shukla; Siavash Irvani. Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles. 1ed. Amsterdã: Elsevier, 2019, v.1, p.137-164.

### 8.2. Artigos publicados em revistas internacionais

- **Pereira, T.M.**, Bonatto, C.C., Silva, L.P. Rapid and Versatile Biosensing of Liposome Encapsulation Efficiency Using Electrical Conductivity Sensor. Biosensors. v. 13, n. 9, ID do artigo 878. 2023. <https://doi.org/10.3390/bios13090878>
- **Pereira, T. M.**, Polez, V.L.P., Sousa, M.H., Silva, L.P. Modulating physical, chemical, and biological properties of silver nanoparticles obtained by green synthesis using different parts of the tree *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos. COLLOID AND INTERFACE SCIENCE COMMUNICATIONS, v. 34, p. 100224, 2020.
- Neto, L.A.A., **Pereira, T.M.**, Silva, L.P. Magnetic nanoparticles coated with carbohydrates for 3D culture of bacteria. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, v. 116, p. 111267, 2020.
- Araujo, T.F., **Pereira, T.M.**, Araujo Neto, L.A., Bonatto, C.C., Silva, L.P. Enzymatic Browning Modulates Properties of Silver Nanoparticles Produced with Banana Peel Extract. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials, v. 30, p. 3702-3708, 2020.

- Neto, L.A.A., **Pereira, T.M.**, Silva, L.P. Evaluation of behavior, growth, and swarming formation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in culture medium modified with silver nanoparticles. *Microbial pathogenesis*, v. 149, p. 104480, 2020.

### **8.3. Artigos submetidos**

- **Pereira, T.M.**, Bonatto, C.C., Magarelli, G., Amaral, A.F.C., Carvalho, W.A., Polez, V.L.P., Silva, L.P. Eco-friendly and bioactive plant extracts unveil antimicrobial properties, antioxidant activity, and eukaryotic cell non-cytotoxicity

- **Pereira, T.M.**, Bonatto, C.C., Silva, L.P. Facile and inexpensive method for the synthesis of self-assembled vegan liposomes using medicinal plants.

### **8.4. Resumos publicados em Anais de eventos**

- Resumo e apresentação oral de e-pôster no IV CDNB (Atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* de lipossomas contendo extrato vegetal);

- Resumo e apresentação oral de e-pôster no III CDNB (Desenvolvimento de lipossomas vegetais para aplicação biomédica);

- Resumo e apresentação oral de pôster no XXVI Encontro do Talento Estudantil (Extratos aquosos e etanólicos de plantas medicinais com atividade contra bactéria Gram-positiva);

- Resumo e apresentação oral de e-pôster no I CDNB (Lipossomas contendo extratos aquosos de plantas medicinais);

- Resumo e apresentação de e-pôster no 23º Simpósio em Ciência e Engenharia de Materiais do PGrCEM (EESC/USP) (Modulation of physical characteristics of silver nanoparticles produced via green synthesis);

- Resumo e apresentação oral de pôster no XXV Encontro do Talento Estudantil (produção de lipossomas à base de plantas medicinais);

- Resumo e apresentação oral de pôster no XXIV Encontro do Talento Estudantil (Produção de lipossomas com propriedades anti-inflamatórias e antibacterianas);

- Resumo no 2º Simpósio Araucária em Biologia Celular e Molecular (Development of superficially modified magnetic nanoparticles with carbohydrates for the cellular culture of microorganisms);

- Resumo e apresentação oral de pôster no IX simpósio da BIOMOL 2019 (Produção e caracterização de nanoestruturas à base de plantas medicinais);

#### **8.4. Atuação como membro da comissão organizadora:**

- I Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia;
- II Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia;
- III Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abubakar, A.R., Haque, M. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *J. Pharm. Bioallied Sci.* v. 12, n. 1, p. 1-10. 2020. [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19).
- Afonso, A.F., Pereira, O.R., Fernandes, A., Calhelha, R.C., Silva, A.M.S., Ferreira, I.C.F.R., Cardoso, S.M. Phytochemical Composition and Bioactive Effects of *Salvia africana*, *Salvia officinalis* 'Icterina' and *Salvia mexicana* Aqueous Extracts. *Molecules.* v. 24, n. 23, ID do artigo 4327. 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24234327>.
- Ahmed, A.F., Attia, F.A.K., Liu, Z., Li, C., Wei, J., Kang, W. Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. *Food Science and Human Wellness.* v. 8, n. 3, p. 299-305. 2019.
- Ahmed, H.M. Ethnomedicinal, Phytochemical and Pharmacological Investigations of *Perilla frutescens* (L.) Britt. *Molecules.* v. 24, n. 1, ID article 102. 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules24010102>.
- Ahmed, N., Karobari, M.I., Yousaf, A., Mohamed, R.N., Arshad, S., Basheer, S.N., Peeran, S.W., Noorani, T.Y., Assiry, A.A., Alharbi, A.S., Yean, C.Y. The Antimicrobial Efficacy Against Selective Oral Microbes, Antioxidant Activity and Preliminary Phytochemical Screening of *Zingiber officinale*, *Infect. Drug. Resist.* v. 15, p. 2773-2785. 2022. <https://doi.org/10.2147/IDR.S364175>.
- Ai, Y. Fang, F., Zhang, L., Liao, H. Antimicrobial activity of oregano essential oil and resveratrol emulsions co-encapsulated by sodium caseinate with polysaccharides. *Food control.* v. 137, ID do artigo 108925. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108925>.
- Akbar, W.A.S., Arokiarajan, M.S., Christopher, J.J., Ahmed, N. Z., Meena, R. Evaluation of bioactive compounds as antimicrobial and antidiabetic agent from the crude extract of *Heliotropium curassavicum* L. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* v. 50, ID do artigo 102745. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102745>.
- Albaquami, J.J., Hamadi, H., Narayanankutty, A., Visakh, N.U., Sasidharan, A., Kuttithodi, A.M., Famurewa, A.C., Pathrose, B. Chemical Composition and Biological Activities of the Leaf Essential Oils of *Curcuma longa*, *Curcuma aromatica* and *Curcuma angustifolia*. *Antibiotics.* v. 11, n. 11, ID do artigo 1547. 2022. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111547>.
- Alkhalaf, M.I., Alansari, W.S., Ibrahim, E.A., ELhalwagy, M.E.A. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities of avocado (*Persea americana*) fruit and seed extract. *J. King Saud. Univ. Sci.* v. 31, n. 4, p. 1358-1362. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.10.010>.

Al-Bandak, G.; Oreopoulou, V. Antioxidant properties and composition of Majorana syriaca extracts. Eur. J. Lipid Sci. Technol. v. 109, p. 247-255. 2007. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600234>.

Al-Hijazeen, M.; Mendonca, A.; Lee, E.J.; Ahn, D.U. Effect of oregano oil and tannic acid combinations on the quality and sensory characteristics of cooked chicken meat. Poultry Sci. v. 97, p. 676-683. 2018. <https://doi.org/10.3382/ps/pex285>

Aljghami, M.E., Saboor, S., Amini-Nik, S. Emerging Innovative Wound Dressings. Annals of Biomedical Engineering, v. 47, p. 659-675. 2019.

Altin, G., Gültekin-Özgülven, M., Ozcelik, B., Liposomal dispersion and powder systems for delivery of cocoa hull waste phenolics via Ayran (drinking yoghurt): Comparative studies on *in-vitro* bioaccessibility and antioxidant capacity. Food Hydrocolloids. v. 81, p. 364–370, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.051>.

Altunbek, M., Kelestemur, S., Culha, M., *In situ* monitoring of biomolecular processes in living systems using surface-enhanced Raman scattering. Biophotonics Japan. v. 9792, 979206, 2015. <https://doi.org/10.1117/12.2207321>.

Amadi, J. E., Salami, S. O., Eze, C. S. Antifungal properties and phytochemical screening of extracts of African basil (*Ocimum gratissimum* L.): Agriculture and Biology Journal of North America. v. 1, n. 2, p. 163-166. 2010. <http://scihub.org/.../1-2-163-166.pdf>

Amarowicz, R., Zegarska, Z., Rafałowski, R., Pegg, R.B., Karamac, M., Kosinska, A. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of ethanolic extracts of thyme, oregano, and marjoram, Eur. J. Lipid Sci. Technol. v. 111, p. 1111-1117. 2009. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800170>.

American Society for Testing and Material, Zeta potential of colloids in water and waste water, ASTM Standard D, p. 4182–4187. 1985.

Amessis-Ouchemoukh, N., Madani, K., Fale, P.L.V., Serralheiro, M.L., Araujo, M.E.M. Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. Ind. Crop. Prod. v. 53, p. 6–15. 2014.

Amira, S. et al., Anti-inflammatory, anti-oxidant, and apoptotic activities of four plant species used in folk medicine in the Mediterranean basin. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. v. 25, n. 1, p. 65-72, 2012.

An, M.; Pratley, J.E.; Haig, T. Phytotoxicity of vulpia residues: I. Investigation of aqueous extracts. J. Chem. Ecol. v. 23, p. 1979-1995. 1997. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006484.57119.84>.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopéia Brasileira, volume 1. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1996. Fasc. 1. Cardoso, C.M.Z. Manual de controle de qualidade de matérias-primas vegetais para farmácia magistral. São Paulo: Pharmabooks, 2009. 148 p.

Arnon, D.I., Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant physiology. v. 24, n. 1, 1949.

Asada, K.; Takahashi, M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In Photoinhibition; Kyle, D. J., Osmond, C. B., Arntzen, C. J., Eds.; Elsevier: Oxford, 1987.

Ascioglu, S., Rex, J.H., de Pauw, B., Bennett, J.E., Bille, J., Crokaert, F., Denning, D.W., Donnelly, J.P., Edwards, J.E., Erjavec, Z., Fiere, D., Lortholary, O., Maertens, J., Meis, J.F., Patterson, T.F., Ritter, J., Selleslag, D., Shah, P.M., Stevens, D.A., Walsh, T.J. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. Clin. Infect. Dis. v. 34, p. 7–14. 2002.

Azimova, S., Marat, Y. Natural Compounds-Alkaloids. Springer Science Business Media New York. 2013.

Azwanida, N.N. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. Med. Aromat. Plants. v. 4, ID do artigo 196. 2015.

Bagiu, R.V., Vlaicu, B., Butnariu, M. hemical composition and in vitro antifungal activity screening of the allium ursinum L (Liliaceae). Int. J. Mol. Sci., v. 13, p. 1426-1436. 2012.

Baranauskaitė, J., Jakstas, V., Ivanauskas, L., Kopustinskiene, D.M., Draksiene, G., Masteikova, R., Bernatoniene, J. Optimization of carvacrol, rosmarinic, oleanolic and ursolic acid extraction from oregano herbs (*Origanum onites* L. *Origanum vulgare* spp. *Hirtum* and *Origanum vulgare* L.) Natural Products Research. v. 30, n. 6, p. 672-674. 2016.

Barragan-Zarate, G.S., Lagunez-Rivera, L., Solano, R., Carranza-Alvarez, C., Hernandez-Benavides, D.M., Vilarem, G. Validation of the traditional medicinal use of a Mexican endemic orchid (*Prosthechea karwinskii*) through UPLC-ESI-qTOF-MS/MS characterization of its bioactive compounds. Heliyon. v. 8, ID do artigo e09867. 2022.

Batista, C.M., Carvalho, C.M.B., Magalhães, N.S.S., Lipossomos e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

Belguith, H., Kthiri, F., Chati, A., Sofah, A.A., Hamida, J.B., Ladoulsi, A. Study of the effect of aqueous garlic extract (*Allium sativum*) on some *Salmonella* serovars isolates. Emirates Journal of Food and Agriculture, v. 22, n. 3, p. 189, 2010. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v22i3.4889>.

Bennett R.N., Wallsgrave, R.W. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*. v. 127, n. 4, p. 617-633. 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x>.

Bertelli, D., Plessi, M., Miglietta, F. Effect of industrial micro-wave treatment on the antioxidant activity of herbs and spices, *Ital. J. Food. Sci.* v. 16, p. 97-103. 2004.

Bhaskaran, N. et al., Chamomile: an anti-inflammatory agent inhibits inducible nitric oxide synthase expression by blocking RelA/p65 activity. *International Journal of Molecular Medicine*. v. 26, n. 6, p. 935-940, 2010.

Bian, J., Girotti, J., Fan, Y., Levy, E.S., Zang, N., Sethuraman, V., Kou, P., Zhang, K., Gruenhagen, J., Lin, J. Fast and versatile analysis of liposome encapsulation efficiency by nanoParticle exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A*. v. 1662, ID do artigo 462688. 2022.

Bian, J., Girotti, J., Fan, Y., Levy, E.S., Zang, N., Sethuraman, V., Kou, P., Zhang, K., Gruenhagen, J., Lin, J. Fast and versatile analysis of liposome encapsulation efficiency by nanoParticle exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A*. v. 1662, ID do artigo 462688. 2022.

Boateng, J.S., Matthews, K., Stevens, H., Eccleston, G.M. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *J. Pharm. Sci.* v. 97, p. 2892-2923. 2007.

Bonato, C.C. Miméticos de hemácias como sistemas de liberação de hidrolisados de hemoglobina com atividades antitumorais *in vitro*. 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

Boppana, R., Kulkarni, R.V., Mutalik, S.S., Setty, C.M., Sa, B. Iota-Carrageenan-based biodegradable Ag<sub>0</sub> nanocomposite hydrogels for the inactivation of bacteria. *Carbohydrate Polymers*. v. 95, n. 1, p. 188-194. 2013.

Boudjelal, A., Smeriglio, A., Ginestra, G., Denaro, M., Trombetta, D. Phytochemical Profile, Safety Assessment and Wound Healing Activity of *Artemisia absinthium* L.. *Plants*. v. 9, n. 12, ID do artigo 1744. 2020. <https://doi.org/10.3390/plants9121744>.

Boukhris, M. et al., Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of Rose-scented Geranium, *Pelargonium graveolens*. *Phytotherapy Research*. v. 27, p. 1206–1213, 2013. <https://doi.org/10.1002/ptr.4853>.

Braga, M.E.M., Leal, P.F., Carvalho, J.E., Meireles, M.A. Comparison of Yield, Composition, and Antioxidant Activity of Turmeric (*Curcuma longa* L.) Extracts Obtained Using Various Techniques. *J. Agric. Food. Chem.* V. 51, n. 22, p. 6604-6611. 2003. <https://doi.org/10.1021/jf0345550>.

Braguini, W.L.; Alves, B.B.; Pires, N.V.; Toxicity assessment of *Lavandula officinalis* extracts in Brine Shrimp (*Artemia salina*). *Toxicol. Mech. Methods.* v. 29, p. 411-420. 2019. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1567892>.

BRASIL, RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Regulamenta o registro de Medicamentos Fitoterápicos (MF) e o registro e a notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos (PTF). Diário oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 14 mai. 2014.

Brasil. Agência de saúde. MS elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. 2009.

Brgles, M., Jurašin, D., Sikirić, M.D., Frkanec, R., Tomašić, J. Entrapment of Ovalbumin into Liposomes—Factors Affecting Entrapment Efficiency, Liposome Size, and Zeta Potential. *Journal of liposome research.* v. 18, n. 3, p. 235-248. 2008. <https://doi.org/10.1080/08982100802312762>.

Bruggisser, R., Daeniken, K.V, Jundt, G., Schaffner, W., Tullberg-Reinert, H. Interference of Plant Extracts, Phytoestrogens and Antioxidants with the MTT Tetrazolium Assay. *Planta Med.* V. 65, n. 5, p. 445-448. 2002. <https://doi.org/10.1055/s-2002-32073>.

Bubalo, M.C., Vidović, S., Redovniković, I.R., Jokić, S. New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents, *Food Bioprod. Process.* v. 109, p. 52-73. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.001>.

Busatta, C., Mossi, A.J., Rodrigues, M.R.A., Cansian, R.L., de Oliveira, J.V. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage, *Braz. J. Microbiol.* v. 38, n. 4, p. 610-616. 2007. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000400006>.

Bussmann, R.W. et al., Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology.* v. 132, p. 101-108, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.048>.

Candela, R.G., Lazzara, G., Piacente, S., Bruno, M., Cavallaro, G., Badalamenti, N. Conversion of Organic Dyes into Pigments: Extraction of Flavonoids from Blackberries (*Rubus ulmifolius*) and Stabilization. *Molecules.* v. 26, n. 20, ID do artigo 6278. 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26206278>.

Capeka, E.; Mareczek, A.; Leja, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of Lamiaceae species. *Food Chem,* v. 93, p. 223-226. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.020>

Cequier-Sánchez, E., Rodríguez, C., Ravelo, Á.G., Zárate, R. Dichloromethane as a Solvent for Lipid Extraction and Assessment of Lipid Classes and Fatty Acids from Samples of Different Natures. *J. Agric. Food Chem.* v. 56, p. 4297-4303. 2008. <https://doi.org/10.1021/jf073471e>.

Chami, F., Chami, N., Bennis, S., Bouchiki, T., Remmal, A., Oregano and clove essential oils induce surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytotherapy Research*. v. 19, n. 5, p. 405-408. 2005. <https://doi.org/10.1002/ptr.1528>.

Chauhan A.K., Kang, S.C. Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella ser typhimurium* in vitro and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model. *Research in Microbiology*. v. 167, n. 7, p. 559-565. 2014.

Chen, C., Johnston, T.D., Jeon, H., Gedaly, R., McHugh, P.P., Burke, T.G., Ranjan, D. An in vitro study of liposomal curcumin: stability, toxicity and biological activity in human lymphocytes and Epstein-Barr virus-transformed human B-cells. *Int. J. Pharm.* v. 366, p. 133–139. 2009.

Chi, H-Y., Lee, C-H., Kim, K-H., Kim, S-L., Chung, I-M. Analysis of phenolic compounds and antioxidant activity with H4IIE cells of three different rice grain varieties, *Eur. Food Res. Technol.* v. 225, p. 887-893. 2007. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0498-3>.

Cohen, M.L. Epidemiology of Drug Resistance: Implications for a Post—Antimicrobial Era. *Science*. v. 5073, p. 1050-1055. 1992. <https://doi.org/10.1126/science.257.5073.1050>.

Contri, R.V., Katzer, T., Ourique, A.F., da Silva, A.L., Beck, R.C., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Combined effects of polymeric nanocapsules and chitosan hydrogel on the increase of capsaicinoids adhesion to the skin surface. *American Scientific Publishers*. v. 10, n. 5, p. 820-830, 2014.

Cooke, J., Dryden, M., Patton, T., Brennan, J., Barrett, J. The antimicrobial activity of prototype modified honeys that generate reactive oxygen species (ROS) hydrogen peroxide. *BMC Res Notes*. v. 8, n. 20. 2015. <https://doi.org/10.1186/s13104-014-0960-4>.

Cooley, M. et al., Influence of particle size and shape on their margination and wall-adhesion: implications in drug delivery vehicle design across nano-to-micro scale. *Nanoscale*. v. 10, n. 32, p. 15350-15364, 2018.

Cortés-Chitala, M.d.C.; Flores-Martínez, H.; Orozco-Ávila, I.; León-Campos, C.; Suárez-Jacobo, A.; Estarrón-Espinosa, M.; López-Muraira, I. Identification and Quantification of Phenolic Compounds from Mexican Oregano (*Lippia graveolens* HBK) Hydroethanolic Extracts and Evaluation of Its Antioxidant Capacity. *Molecules*. v. 26, p. 1-18. 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules26030702>.

Cunha, A.P. *Farmacognosia e fitoquímica*. 2 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 670 p. 2009.

Da, X., Nishiyama, Y., Tie, D., Hein, K.Z., Yamamoto, O., Morita, E. Antifungal activity and mechanism of action of Ou-gon (Scutellaria root extract) components against pathogenic fungi. *Scientific Reports*. v. 9, ID do artigo 1683. 2019.

Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, 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, ID do artigo 57. 2018. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.

Danh, L.T., Han, L.N., Triet, N.D.A., Zhao, J., Mammucari, R., Foster, N. Comparison of Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Lavender (*Lavandula angustifolia* L.) Essential Oils Extracted by Supercritical CO<sub>2</sub>, Hexane and Hydrodistillation, *Food Bioprocess Technol*. v. 6, p. 3481-3480. 2013. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-1026-z>.

Daraee, H.D., Etemadi, A., Kouhi, M., Alimirzalu, S., Akbarzadeh, A. Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol*. v. 44, p. 381-391. 2016. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.953633>.

Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 98, p. 13454–13459. 2001.

Diezmann, S. Oxidative stress response and adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the model eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* and its human pathogenic relatives *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Fungal Biology Reviews*. v. 28, n. 4, p. 126-136. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2014.12.001>.

Dobros, N., Zawada, K., Paradowska, K. Phytochemical Profile and Antioxidant Activity of *Lavandula angustifolia* and *Lavandula x intermedia* Cultivars Extracted with Different Methods. *Antioxidants*. v. 11, n. 4, ID do artigo 711. 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11040711>

Doughari J.H. Phytochemicals: Extraction methods, basic structures, and mode of action as potential chemotherapeutic agents, phytochemicals—a global perspective of their role in nutrition and health. In: Venketeshwer R, editor. *A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. InTech; 2012.

Dravid, A.A., Dhanabalan, K.M., Naskar, S., Vashistha, A., Agarwal, S., Padhan, B., Dewani, M., Agarwal, R. Sustained release resolvin D1 liposomes are effective in the treatment of osteoarthritis in obese mice. v. 11, p. 765-777. 2023. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37512>.

Dunford, N.T., Temelli, F. Extraction of phospholipids from canola with supercritical carbon dioxide and ethanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. v. 72, n. 9, p. 1009-1015, 1995.

Dunnill, C., Patton, T., Brennan, J., Barrett, J., Dryden, M., Cooke, J. Leaper, D., Georgopoulos, N.T. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int. Wound. J.* v. 14, n. 1, p. 89-96. 2015. <https://doi.org/10.1111/iwj.12557>.

Durand, E., Lecomte, J., Upasani, R., Chabi, B., Bayrasy, C., Baréa, B., Jublanc, E., Clarke, M.J., Moore, D.J., Crowther, J., Wrutniak-Cabello, C., Villeneuve, P. Evaluation of the ROS Inhibiting Activity and Mitochondrial Targeting of Phenolic Compounds in Fibroblast Cells Model System and Enhancement of Efficiency by Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) Formulation, *Pharmaceutical Research*. v. 34, p. 1134-1146. 2017. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2124-4>.

Dutta, T., Anand, U., Mitra, S.S., Ghorai, M., Jha, N.K., Shaikh, N.K., Shekhawat, M.S., Pandey, D.K., Proćków, J., Dey, A. Phytotherapy for Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): A Systematic Review and Meta-analysis. *Front. Pharmacol.* v. 13, p. 1-17. 2022. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.827411>.

Dyas, L., Goad, L.J., Steryl fatty acyl esters in plants. *Phytochemistry*. v. 34, n. 1, p. 17-29. 1993.

Eke, G., Mangir, N., Hasirci, N., Macneil, S., Hasirci, V. Development of a UV crosslinked biodegradable hydrogel containing adipose derived stem cells to promote vascularization for skin wounds and tissue engineering. *Biomaterials*. v. 129, p. 188-198. 2017.

Enani, M.A. Antimicrobial resistance: Insights from the declaration of world alliance against antibiotic resistance. *Saudi Medical Journal*. v. 36, n. 1, p. 11-12. 2015

Engelhardt, K., Price, E., Bakowsky, U. Visualization and Characterization of Liposomes by Atomic Force Microscopy. v. 2622, p. 253-263. 2023.

Et-Touys, A., Fellah, H., Mniouil, M., Bouyahya, A., Dakka, N., Abdennebi, E.H., Sadak, A., Bakri, Y. Screening of Antioxidant, Antibacterial and Antileishmanial Activities of *Salvia officinalis* L. Extracts from Morocco, *Br. Microbiol. Res. J.* v. 16, n. 5, p. 1-10. 2016. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2016/28307>.

Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A., Boskou, D. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory, *J. Agric. Food Chem.* v. 509, p. 5294-5299. 2002. <https://doi.org/10.1021/jf020408a>.

Façanha Filho, P.F. et al., High temperature Raman spectra of L-leucine crystals. *Brazilian Journal of Physics*. v. 38, n. 1, p. 131–137, 2008. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-97332008000100024>.

Fernández-León, M.F. et al., Fast and accurate alternative UV-chemometric method for the determination of chlorophyll A and B in broccoli (*Brassica oleracea* Italica) and cabbage (*Brassica oleracea* Sabauda) plants. *Journal of Food Composition and Analysis*. v. 23, n. 8, p. 809–813, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.024>.

Figueiredo, L.P. et al., Raman spectroscopy for the differentiation of *Arabica coffee* genotypes. *Food Chemistry*. v. 288, p. 262–267, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.093>.

Flores, T., Todd, C.D., Tovar-Mendez, A., Dhanoa, P.K., Correa-Aragunde, N., Hoyos, M.E., Brownfield, D.M., Mullen, R.T., Lamattina, L., Polacco, J.C. Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant. Physiol*. v. 147, p. 1936–1946. 2008.

Foissner, I., Wendehenne, D., Langebartels, C., Durner, J. In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant. J*. v. 23, p. 817–824. 2001.

Fu, S., Arráez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Menéndez, J.A., Menéndez-Gutiérrez, M.P., Micol, V., Fernández-Gutiérrez, A. Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells, *Anal. Bioanal. Chem*. v. 397, p. 643-654. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3604-0>.

Gao, Y., Liu, X., Chen, N., Yang, X., Tang, F. Recent Advance of Liposome Nanoparticles for Nucleic Acid Therapy. *Pharmaceutics*. v. 15, ID do artigo 178. 2023. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010178>.

Garcês, H., Durzan, D., Pedroso, M.C. Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot*. v. 87, p. 567–574. 2001.

Gelder, J.D. et al., Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy*. v. 38, p. 1133–1147, 2007. <https://doi.org/10.1002/jrs.1734>.

Generalić, I., Skroza, D., Šurjak, J., Možina, S.S., Ljubenković, I., Katalinić, A., Šimat, V., Katalinić, V. Seasonal Variations of Phenolic Compounds and Biological Properties in Sage (*Salvia officinalis* L.), *Chem. Biodivers*. v. 9, p. 441-457. 2012. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100219>.

Ghiasian, M., Niroomandi, Z., Dastan, D., Poorolajal, J., Zare, F., Ataei, S. Clinical and phytochemical studies of *Plantago major* in pressure ulcer treatment: A randomized controlled trial. *Complement. Ther. Clin. Pract*. v. 43, ID do artigo 101325. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2021.101325>.

Gortzi, O., Lalas, S., Chinou, I., Tsaknis, J. Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. *Eur. Food Res. Technol.* v. 226, p. 583-590. 2008. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0592-1>.

Gragnani, A. Morgan, J.R. Ferreira, L.M., 2002, Differentiation and barrier formation of a cultured composite skin graft. v. 23, n. 2, p. 126-131. 2002.

Grebennikova, O. et al., Adaptive capacity of some lavender and lavandin Cultivars *in vitro* and *in situ*. *AGROFOR International Journal.* v. 2, n. 1, 2017. <https://doi.org/10.7251/AGRENG1701091G>.

Grygier, A. Mustard Seeds as a Bioactive Component of Food. *Food Rev. Int.* v. 39, n. 7, p. 4088-4101. 2022. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.2015774>.

Güçlü-Üstündağ, Ö., Mazza, G. Saponins: Properties, Applications and Processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* v. 3, p. 231-258. 2007. <https://doi.org/10.1080/10408390600698197>.

Gunjan, M., Naing, T.W., Saini, R.S., bin Ahmad, A., Naidu, J.R., Kumar, I. Marketing trends & future prospects of herbal medicine in the treatment of various disease, *World J. Pharm. Res.* v. 4, p. 132-155. 2015.

Habib, M.J., Asker, A.F. Photostabilization of riboflavin by incorporation into liposomes. *J. Parenter. Sci. Technol.* v. 45, p. 124–127. 1991.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica.* v. 4, p. 1–9, 2001. [http://paleo-electronica.org/2001\\_1/past/issue\\_01.htm](http://paleo-electronica.org/2001_1/past/issue_01.htm).

Hao, D.C., Xiao, P.G. Network Pharmacology: A Rosetta Stone for Traditional Chinese Medicine. *Drug Dev. Res.* v. 75, p. 299–312. 2014.

Heinonen, E.M., Meyer, A.S., Frankel, E.N. Antioxidant Activity of Berry Phenolics on Human Low-Density Lipoprotein and Liposome Oxidation, *J. Agric. Food Chem.* v. 46, p. 4107-4112. 1998. <https://doi.org/10.1021/jf980181c>.

Heng-Moss, T.M. et al., Comparison of chlorophyll and carotenoid concentrations among russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae)-Infested wheat isolines, *Journal of Economic Entomology.* v. 96, n. 2, p. 475–481, 2003.

Hocevar, B.A. Morrow, D.M., Tykocinski, M.L. Helds, A.P. Protein kinase C isotypes in human erythroleukemia cell proliferation and differentiation. *J. Cell. Sci.* v. 101, n. 3, p. 671-679. 1992. <https://doi.org/10.1242/jcs.101.3.671>.

Hofland, H.E.J. et al., Interactions between liposomes and human stratum corneum *in vitro*: freeze fracture electron microscopical visualization and small angle X-ray scattering studies. *British Journal of Dermatology*. v. 1995, n. 132, p.853-856, 1995.

Honary, S., Zahir, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). *Trop. J. Pharm. Res.* v. 12, p. 265-273. 2013. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.20>.

Hong, J.K., Yun, B.W., Kang, J.G., Raja, M.U., Kwon, E., Sorhagen, K., Chu, C., Wang, Y., Loake, G.J. Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *J. Exp. Bot.* v. 59, p. 147–154. 2008.

Hoque, A.S., Bithika, G., Rimlee, N., Roy, S.B., Pallab, K., Kumar, D.B. Pharmacognostical evaluation and phytochemical Screening of the plant *Equisetum arvense*. *World Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, v. 5, n. 5, p. 1537-1543. 2016.

Hossain, M.A., AL-Raqmi, K.S., ALmijzy, Z.H., Weli, A.M., Al-Riyami, Q. Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. v. 3, n.9, p. 705-710. 2013. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60142-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60142-2).

Hossain, M.A., Kabir, M.J., Salehuddin, S.M., Rahman, S.M.M., Das, A.K., Singha, S.K. Alam, M.K., Rahman, A. Antibacterial properties of essential oils and methanol extracts of sweet basil *Ocimum basilicum* occurring in Bangladesh, *Pharm. Biol.* v. 48, n. 5, p. 504-511. 2010. <https://doi.org/10.3109/13880200903190977>.

Hsouna, A.B., Hamdi, N. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils and organic extracts from *pelargonium graveolens* growing in Tunisia. *Lipids Health Dis.* v. 11, ID do artigo 167. 2012. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-167>.

Hu, Z.S., Hsu, S.M., Sen Wang, P., Tribochemical reaction of stearic acid on copper surface studied by surface enhanced Raman spectroscopy. *Tribology Transactions*. v. 35, p. 417–422, 1992. <https://doi.org/10.1080/10402009208982137>.

Huan, H., Shen, J., Wan, S., Han, L., Dou, G., Sun, L. Wet-Adhesive Multifunctional Hydrogel with Anti-swelling and a Skin-Seamless Interface for Underwater Electrophysiological Monitoring and Communication. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. v. 15, n. 9, p. 11549-11562. 2023. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c21595>.

Ifesan, B.O.Y., Fashakin, J.F., Ebosele, F., Oyerinde, A.S. Antioxidant and antimicrobial properties of selected plant leaves, *European J. Med. Plants*.v. 3, p. 465-473. 2013. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2013/3383>.

Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food. Chem.* v. 126, p. 1821-1835. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>.

Ijaz, S., Akhtar, N., Khan, M.S., Hameed, A., Irfan, M., Arshad, M.A., Ali, S., Asrar, M. Plant derived anticancer agents: A green approach towards skin cancers, *Biomed Pharmacother.* v. 103, p. 1643-1651. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.113>.

Ismail, A.M., Ouaid, T., Al-Amery, M., Maulood, B., Serson, W. A PRELIMINARY STUDY OF PHYTOCHEMICALS IN *EQUISETUM ARVENSE* & *E. RAMOSISSIMUM* (EQUISETACEAE) EXTRACTS FROM NORTHERN IRAQ. *Fern. Gaz.* v. 21, n. 3, p. 115-121. 2020.

Istrati, D., Lacatusu, I., Bordei, N., Badea, G., Oprea, O., Stefan, L.M., Stan, R., Badea, N., Meghea, A. Phyto-mediated nanostructured carriers based on dual vegetable actives involved in the prevention of cellular damage. *Mater. Sci. Eng. C.* v. 64, p. 249-259. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.087>.

Jakovljević, M.R., Grujičić, D., Vukajlović, J.T., Marković, A., Milutinović, M., Stanković, M., Vuković, N., Vukić, M., Milošević-Djordjević, O. In vitro study of genotoxic and cytotoxic activities of methanol extracts of *Artemisia vulgaris* L. and *Artemisia alba* Turra. *S. Afr. J. Bot.* v. 132, p. 117-126. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.04.016>.

Jana, J., Tjarnhage, T., Puu, G. From Liposomes to Supported, Planar Bilayer Structures on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces: An Atomic Force Microscopy Study. *Biophysical journal.* v. 79, p. 3153-3163. 2000.

Javanmardi, J., Khalighi, A., Kashi, A., Bais, H.P., Vivanco, J.M. Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran, *J. Agric. Food Chem.* v. 50, p. 5878-5883. 2002. <https://doi.org/10.1021/jf020487q>.

Jedrejek, D., Lis, B., Rolnik, A., Stochmal, A., Olas, B. Comparative phytochemical, cytotoxicity, antioxidant and haemostatic studies of *Taraxacum officinale* root preparations. *Food Chem. Tox.* v. 126, p. 233-247. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.02.017>

Joshi, A., Paratkar, S.G., Thorat, B.N., Modification of lecithin by physical, chemical and enzymatic methods. *European Journal of Lipid Science and Technology.* v. 108, p. 363-373, 2006. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600016>.

Juan, C.A., Lastra, J.M.P.d.l., Plou, F.J., Pérez-Lebeña, E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* v. 22, n. 9, ID do artigo 4642. 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>.

Juberg, P., Cabral Neto, J.B., Schall, V.T. Molluscicide activity of the "Avelós" plant (*Euphorbia tirucalli*, L.) on *Biomphalaria glabrata*, the mollusc vector of schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v. 80, n. 4, p. 423–427. 1985. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761985000400007>.

Kakande, T., Batunge, Y., Eilu, E., Shabohurira, A., Abimana, J., Akinola, S.A., Muhwezi, R., Adam, A.S., Onkoba, S.K., Aliero, A.A., Atuheire, C., Kato, C.D., Ntulume, I. Prevalence of Dermatophytosis and Antifungal Activity of Ethanolic Crude Leaf Extract of *Tetradenia riparia* against Dermatophytes Isolated from Patients Attending Kampala International University Teaching Hospital, Uganda. *Dermatology Research and Practice.* v. 2019, ID do artigo 9328621. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9328621>.

Kaliaperumal, V., Hamaguchi, H., Casting new physicochemical light on the fundamental biological processes in single living cells by using raman microspectroscopy. *The Chemical Record.* v. 12, p. 567–580, 2012. <https://doi.org/10.1002/tcr.201200008>.

Kang, J.I., Park, K.M. Advances in gelatin-based hydrogels for wound management. *Journal of Materials Chemistry B.* v. 9, p. 1503-1520. 2020.

Kang, N.S., Lee, J.H. Characterisation of phenolic phytochemicals and quality changes related to the harvest times from the leaves of Korean purple perilla (*Perilla frutescens*). *Food Chem.* V.124, n. 2, p. 556-562. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.071>

Karakas, F.P., Turker, A.U., Karakas, A., Mshvildadze, V., Pichette, A., Legault, J. I. vitro cytotoxic, antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activities and phenolic content in wild-grown flowers of common daisy—A medicinal plant. *J. Herb. Med.* V. 8, p. 31–39. 2017.

Kartsev, V.G. Natural compounds in drug discovery. Biological activity and new trends in the chemistry of isoquinoline alkaloids. *Med Chem Res.* v. 13, p. 325-336. 2004.

Kasugai, S., Hasegawa, N., Ogura, H. Application of the MTT Colorimetric Assay to Measure Cytotoxic Effects of Phenolic Compounds on Established Rat Dental Pulp Cells, *JDR.* V. 70, p. 127-130. 1991. <https://doi.org/10.1177/002203459107000206>.

Khalaf, N.A., Shakya, A.K., Al-Othman, A., El-Agbar, Z., Farah, H. Antioxidant Activity of Some Common Plants, *Turk J. Biol.* v. 32, p. 51-55. 2008. <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol32/iss1/8>.

Khan, T., Ali, M., Khan, A., Nisar, P., Jan, S.A., Afridi, S., Shinwari, Z.K. ‘Anticancer Plants: A Review of the Active Phytochemicals, Applications in Animal Models, and Regulatory Aspects’, *Biomolecules.* V. 10, ID do artigo 47. 2019. <https://doi.org/10.3390/biom10010047>.

Kim, K.Y., Nanotechnology platforms and physiological challenges for cancer therapeutics. *Nanomedicine.* V. 3, p. 103-110, 2007.

Kirchherr, A-K., Briel, A., Mäder, K. Stabilization of Indocyanine Green by Encapsulation within Micellar Systems. *Mol. Pharmaceutics*. V. 6, p. 480-491. 2009. <https://doi.org/10.1021/mp8001649>.

Kljusurić, J.G., Benković, M., Bauman, I. Classification and Processing Optimization of Barley Milk Production Using NIR Spectroscopy, Particle Size, and Total Dissolved Solids Analysis. *J. Chem.* v. 2015, ID do artigo 896051. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/896051>.

Kljusurić, J.G., Benković, M., Bauman, I. Classification and Processing Optimization of Barley Milk Production Using NIR Spectroscopy, Particle Size, and Total Dissolved Solids Analysis. *J. Chem.* v. 2015, ID do artigo 896051. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/896051>.

Kohnno, M. Applications of electron spin resonance spectrometry for reactive oxygen species and reactive nitrogen species research. *J. Clin. Biochem. Nutr.* v. 47, p. 1-11. 2010. <https://doi.org/10.3164/jcbn.10-13R>.

Koldas, S., Demirtas, I., Ozen, T., Demirci, M.A. Behçet, L. Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. *viride* (Boiss.) Hayek, a plant of traditional usage. *J. Sci. Food Agric.* v. 95, n. 4, p. 786-798. 2015. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6903>.

Kosar, M.; Dorman, H.J.D.; Bachmayer, O.; Baser, K.H.C.; Hiltunen, R. An Improved On-Line HPLC-DPPH Method for the Screening of Free Radical Scavenging Compounds in Water Extracts of Lamiaceae Plants. *Chem. Nat. Compd.*v. 39, p. 161-166. 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1024853628326>.

Kuiper, D., Kuiper, P.J. Lipid Composition of the Roots of *Plantago* Species: Response to Alteration of the Level of Mineral Nutrition and Ecological Significance. *Physiol. Plant.* v. 44, n. 2, p. 81-86. 1978. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1978.tb01618.x>.

Kutchan, T.M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism, *Plant. Physiol.*v. 125, p. 58-80. 2001. <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.58>.

Lai, R.C., Topical application of yolk lecithin liposomes reinforces skin barrier function against chemical agents such as psoriasis-inducing IMQ and Alleviates disease phenotype. *Clinical and Experimental Dermatology Therapies*. V. 2018, n. 1, p. 1-10, 2018.

Lambert, J., Srivastava, J., Vietmeyer, N. *Medicinal Plants: Rescuing a Global Heritage*; World Bank Publications: Washington, DC, USA. V. 355, 1997.

Lan, G., Zhu, S., Chen, D., Zhang, H. Zou, L. Zeng, Y. Highly Adhesive Antibacterial Bioactive Composite Hydrogels With Controllable Flexibility and Swelling as Wound Dressing for Full-

Thickness Skin Healing. *Front. Bioeng. Biotechnol.* V. 9, ID do artigo. 2021. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.785302>.

Laouini, A., Charcosset, C., Fessi, H., Holdich, R.G., Vladisavljević, G.T. Preparation of liposomes: A novel application of microengineered membranes—From laboratory scale to large scale. *Colloids Surf. B.* v. 112, p. 272-278. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.07.066>.

Le, V., Dolganyuk, V., Sukhikh, A., Babich, O., Ivanova, S., Prosekov, A., Dyshlyuk, L. Phytochemical Analysis of *Symphytum officinale* Root Culture Extract. *Appl. Sci.* v. 11, n. 10, ID do artigo 4478. 2021. <https://doi.org/10.3390/app11104478>.

Leitged, M. Knez, Ž. Primožič, M. Sustainable technologies for liposome preparation. *J. Supercrit. Fluids.* v. 165, ID do artigo 104984. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104984>.

Leo, V.D., Milano, D., Mancini, E., Comparelli, R., Giotta, L., Nacci, A., Longobardi, F., Garbetta, A., Agostiano, A., Catucci, L. Encapsulation of Curcumin-Loaded Liposomes for Colonic Drug Delivery in a pH-Responsive Polymer Cluster Using a pH-Driven and Organic Solvent-Free Process. *Molecules.* v. 23, n. 4, ID do artigo 739. 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23040739>.

Li, Y., Wang, X., Ernst, R.K., A rapid one-step method for the characterization of membrane lipid remodeling in *Francisella* using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight tandem mass spectrometry. *RCM.* V. 25, n. 18, p. 2641–2648, 2011. <https://doi.org/10.1002/rcm.5168>.

Li, Y., Zhu, C., Fan, D., Fu, R., Ma, P., Duan, Z., Li, X., Lei, H., Chi, L. A Bi-Layer PVA/CMC/PEG Hydrogel with Gradually Changing Pore Sizes for Wound Dressing. *Macromolecular Bioscience.* V. 19, n. 5, p. 1800424. 2019.

Li, Z., Liu, L., Chen, Y. Dual dynamically crosslinked thermosensitive hydrogel with self-fixing as a postoperative anti-adhesion barrier. *Acta Biomaterialia.* V. 110, p. 119-129. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.04.034>.

Liang, X. Mao, G. Simon Ng, K.Y., Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. *Journal of Colloid and Interface Science.* V. 278, p. 53-62, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.05.042>.

Liu, X. et al., Liposome-mediated enhancement of the sensitivity in immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering at gold nanosphere array substrate. *Talanta.* V. 75, n. 3, p. 797–803, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.12.017>.

Liu, Y., Nair, M.G., An Efficient and Economical MTT Assay for Determining the Antioxidant Activity of Plant Natural Product Extracts and Pure Compounds. *Journal of Nature Products.* v. 73, n.7, p. 1193-1195. <https://doi.org/10.1021/np1000945>.

Lucini, L., Pellizzoni, M., Pellegrino, R., Molinari, G.P., Colla, G. Phytochemical constituents and in vitro radical scavenging activity of different Aloe species. *Food Chem.* v. 170, n. 1, p. 501-507. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.034>.

Mainardes, R.M., Urban, M.C.C., Cinto, P.O., Chaud, M.V., Evangelista, R.C., Gremião, M.P.D. Liposomes and Micro/Nanoparticles as Colloidal Carriers for Nasal Drug Delivery. *Current Drug Delivery.* V. 3, p. 275-285. 2006.

Malheiros, P.S., Daroit, D.J., Brandelli, A. Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends Food. Sci. Technol.* v. 21, p. 244-292. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.03.003>.

Malik, E.M., Müller, C.E. Anthraquinones As Pharmacological Tools and Drugs. *Med. Res. Rev.* v. 36, p. 705-748. 2016. <https://doi.org/10.1002/med.21391>.

Manea, A-M., Vasile, B.S., Meghea, A. Antioxidant and antimicrobial activities of green tea extract loaded into nanostructured lipid carriers. *C. R. Chim.* v. 17, n. 4, p. 331-341. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2013.07.015>.

Mao, Y., Hao, J., Jin, Z.-Q., Niu, Y.-Y., Yang, X., Liu, D., Cao, R., Wu, X.-Z. Network pharmacology-based and clinically relevant prediction of the active ingredients and potential targets of Chinese herbs in metastatic breast cancer patients. *Oncotarget.* V. 8, ID do artigo 27007. 2017.

Mapong, S. Umsumarng, S., Semmarath, W., Arjsri, P.I., Thippraphan, P., Yodkeeree, S., Limtrakul (Dejkriengkraikul), P. Skin Wound-Healing Potential of Polysaccharides from Medicinal Mushroom *Auricularia auricula-judae* (Bull.)

Marmitt, D.; Shahrajabian, M.H. Plant species used in Brazil and Asia regions with toxic properties. *Phytother. Res.* v. 35, p. 4703–4726. 2021.

Marmitt, D.J. et al., Plantas medicinais da RENISUS com potencial anti-inflamatório: Revisão sistemática em três bases de dados científicas. *Etnofarmacologia.* V. 9, n. 2, p. 73-159, 2015.

Martinez, M.V., Whitaker, J.R., The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology.* V. 6, n. 6, p. 195–200, 1995. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89054-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89054-8).

Masuda, T., Yonemori, S., Oyama, Y., Takeda, Y., Tanaka, T., Andoh, T., Shinohara, A., Nakata, M. Evaluation of the Antioxidant Activity of Environmental Plants: Activity of the Leaf Extracts from Seashore Plants. *Journal of agricultural and food chemistry.* V. 47, n. 4, p. 1749-1754. 1999.

McChesney, J.D., Venkataraman, S.K., Henri, J.T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry*. V. 68, n. 14, p. 2015-2022. 2007.

Mera, I.F., Falconí, D.E.G., Córdova, V.M. Secondary metabolites in plants: main classes, phytochemical analysis and pharmacological activities. *Ibero American Journal of Biotechnology and Life Sciences*. V. 4, n. 4, p. 1000-1009. 2019. <https://doi.org/10.21931/RB/2019.04.04.11>.

Merecz-Sadowska, A., Sitarek, P., Kucharska, E., Kowalczyk, T., Zajdel, K., Cegliński, T., Zajdel, R. Antioxidant Properties of Plant-Derived Phenolic Compounds and Their Effect on Skin Fibroblast Cells, *Antioxidants*. v. 10, ID do artigo 726. 2021. <https://doi.org/10.3390/antiox10050726>.

Miguel, S.P., Ribeiro, M.P., Brancal, H., Coutinho, P., Correia, I.J. Thermoresponsive chitosan–agarose hydrogel for skin regeneration. *Carbohydrate polymers*. V. 111, p. 366-373. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.093>.

Mishra, A., Behura, A., Kumar, A., Ghosh, A., Naik, L., Mawatwal, S., Mohanty, S.S., Mishra, A., Saha, S., Bhutia, S.K., Singh, R., Dhiman, R. Soybean lectin induces autophagy through P2RX7 dependent activation of NF- $\kappa$ B-ROS pathway to kill intracellular mycobacteria. *BBA*. v. 1865, n. 2, ID do artigo 129806. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129806>.

Mohan, A. et al., Liposome encapsulation of anionic and cationic whey peptides: Influence of peptide net charge on properties of the nanovesicles. *LWT*. V. 87, p. 40–46, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.072>.

Monerris, M. Brogli, M.F., Yslas, E., Barbero, C.A., Rivarola, C.R. Highly effective antimicrobial nanocomposites based on hydrogel matrix and silver nanoparticles: long-lasting bactericidal and bacteriostatic effects. V. 15, p. 8059-8066. 2019.

Monfardini, C., Veronese, F.M. Stabilization of substances in circulation. *Bioconjug. Chem*. v. 9, p. 418–450. 1998.

Montanari, L., Fantozzia, P., Snyder, J.M., King, J.W., Selective extraction of phospholipids from soybeans with supercritical carbon dioxide and ethanol. *Journal of Supercritical Fluids*. V. 14, n. 1999, p. 87-93, 1997.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. V. 65, p. 55- 63. 1983.

Muñoz-Shugulí, C. Vidal, C.P., Cantero-López, P., Lopez-Polo, J. Encapsulation of plant extract compounds using cyclodextrin inclusion complexes, liposomes, electrospinning and their combinations for food purposes. *Trends in Food Science & Technology*. V. 108, p. 177-186. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.020>.

Neagu, E., Păun, G., Radu, L.G., Phytochemical study of some *Symphytum officinalis* extracts concentrated by membranous procedures. *UPB Scientific Bulletin, Series B.* v. 73, n. 3, p. 65-74. 2011.

Nguyen, V.L., A simple solid-phase extraction method for the analysis of red cell phospholipids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* V. 32, n. 6, p. 1-5, 2018.

Niculescu, A.G., Grumezescu, A.M. An Up-to-Date Review of Biomaterials Application in Wound Management. *Polymers.* V. 14, n. 3, ID do artigo 421. 2022.

Niizu, P.Y., Rodriguez-Amaya, D.B. Flowers and Leaves of *Tropaeolum majus* L. as Rich Sources of Lutein. *JFS.* v. 70, n. 9, p.605-609. 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb08336.x>

Nieuwenhuyzen, W.V., Tomas M.C. Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *European Journal of Lipid Science and technology.* V. 110, n. 5, p. 472-486. 2008. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800041>.

Ninomiya, K.T., Shioiri, T., Yamada, S., Phosphorus in organic synthesis – VII: Diphenyl phosphoramidate (DPPA). A new convenience reagent for modified curtius reaction. *Tetrahedron.* V. 30, p. 2151-2157, 1974.

Nourbakhsh, F., Lotfalizadeh, M., Badpeyma, M., Shakeri, A., Soheili, V. From plants to antimicrobials: Natural products against bacterial membranes. *Phytotherapy research.* V. 36, n. 1, p. 33-52. 2021.

Organização Mundial da Saúde. 62<sup>a</sup> Assembleia Mundial da Saúde. *Medicina Tradicional.* A62/8. 2009.

Oroian, M., Escriche, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis, *Food Res. Int.* v. 74, p. 10-36. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.018>.

Pal, S.K., Shukla, Y. Herbal medicine: Current status and the future. *Asian Pac J. Cancer Prev.* v. 4, p. 281–288. 2003.

Paltiyan, J.C., Dumale, J.V., Divina, C.C., Phytochemical Analysis, Larvicidal Activity and Cytotoxic Properties of *Malvarosa* (*pelargonium graveolens*) Leaf Extract, *International Journal of Agricultural Technology.* V. 12, n. 7.3, p. 2281-2295. 2017.

Papahadjopoulos, D.; Watkins, J.C., Phospholipid model membranes. II. Permeability properties of hydrated liquid crystals. *Biochimica et Biophysica Acta.* V. 135, p. 639-652, 1967.

Parhi, B., Bjaratiya, D., Swain, S.K. Application of quercetin flavonoid based hybrid nanocomposites: A review. *SPJ*. V. 28, p. 1719-1732. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.10.017>.

Pawlukojć, A. et al., l-Cysteine: Neutron spectroscopy, Raman, IR and ab initio study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. V. 61, p. 2474–2481, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2004.09.012>.

Pereira, V., Dias, C., Vasconcelos, M.C., Rosa, E., Saavedra, M.J. Antibacterial activity and synergistic effects between Eucalyptus globulus leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). *Industrial Crops and Products*. v. 52, p. 1-7. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.09.032>.

Pevzner, E., Ehrenberg, B., Loew, L.M., On the membrane binding of the potentiometric probe Di-4-ANEPPS: A fluorescence and resonance Raman study. *Spectroscopy Letters*. V. 26, n. 7, p. 1181-1193, 1993. <https://doi.org/10.1080/00387019308011602>.

Pfalzgraff, A., Brandenburg, K., Weindl, G. Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds, *Front. Pharmacol.* v. 9, ID do artigo 281. 2018. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00281>.

Phan, T-T., Wang, L., See, P., Grayer, R.J., Chan, S-Y., Lee, S.T. Phenolic Compounds of *Chromolaena odorata* Protect Cultured Skin Cells from Oxidative Damage: Implication for Cutaneous Wound Healing, *Biol. Pharm. Bull.* v. 24, p. 1373-1379. 2001. <https://doi.org/10.1248/bpb.24.1373>.

Pizzale, L., Bortolomeazzi, R., Vichi, S., Überegger, E., Conte, L.S. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and S 157ruticose) and oregano (*Origanum onites* and *O. onites*) extracts related to their phenolic compound content, *J. Sci. Food Agr.* v. 82, p. 1645-1651. 2002. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1240>.

Pizzi, A. Tannins: Prospectives and Actual Industrial Applications. *Biomolecules*. V. 9, ID do artigo 344. 2019. <https://doi.org/10.3390/biom9080344>.

Poudel, A., Gachumi, G., Purves, R., Badea, I. El-Aneed, A. Determination of phytosterol oxidation products in pharmaceutical liposomal formulations and plant vegetable oil extracts using novel fast liquid chromatography – Tandem mass spectrometric methods. *Anal. Chim. Acta*. V. 1194, ID do artigo 339404. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339404>.

Prestinaci, F., Pezzotti, P., Pantosti, A. Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*. V. 109, n. 7, p. 309-318. 2015.

Prinsloo, G. Nogemane, N. The effects of season and water availability on chemical composition, secondary metabolites and biological activity in plants. *Phytochem Rev.* v. 17, p. 889-902. 2018. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9567-z>.

Qi, L., Zhang, C., Wang, B., Yin, J., Yan, S. Progress in Hydrogels for Skin Wound Repair, *Macromol. Biosci.* v. 22, ID do artigo 2100475. 2022. <https://doi.org/10.1002/mabi.202100475>.

Quijia, C.R. et al., Liposomes composed by membrane lipid extracts from macrophage cell line as a delivery of the trypanocidal N,N'-Squaramide 17 towards *Trypanosoma cruzi*. *Materials.* v. 13, n. 23, p. 5505, 2020. <https://doi.org/10.3390/ma13235505>.

Reszczyńska, E. Hanaka, A. Lipids Composition in Plant Membranes. *Cell Biochem. Biophys.* v. 78, p. 401-414. 2020. <https://doi.org/10.1007/s12013-020-00947-w>

Rhoades, J.D. Salinity: Electrical Conductivity and Total Dissolved Solids. *Cover Crops and Soil Ecosystem Services.* ID do artigo 14. 1996. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c14>.

Rhoades, J.D. Salinity: Electrical Conductivity and Total Dissolved Solids. *Cover Crops and Soil Ecosystem Services.* v. 14. 1996. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c14>.

Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A-H., Khalel, K.I. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts, *Ind. Crops Prod.* v. 43, p. 827-831. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.029>.

Rubayiza, A.B., Meurens, M., Chemical discrimination of Arabica and Robusta coffees by fourier transform raman spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* v. 53, n. 12, p. 4654-4659, 2005. <http://doi.org/10.1021/jf0478657>.

Rungsung W, Ratha KK, Dutta S, Dixit AK, Hazra J. Secondary metabolites of plants in drugs discovery. *World J Pharm Res.* v. 4, p. 604-613. 2015.

Saleem, A. Afzal, M., Naveed, M., Makhdoom, S.I., Mazhar, M., Aziz, T., Khan, A.A., Kamal, Z., Shahzad, M., Alharbi, M., Alshammari, A. HPLC, FTIR and GC-MS Analyses of *Thymus vulgaris* Phytochemicals Executing In Vitro and In Vivo Biological Activities and Effects on COX-1, COX-2 and Gastric Cancer Genes Computationally. *Molecules.* v. 27, n. 23. ID do artigo 8512. 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27238512>.

Salim, A., Rahman, S.A., Khamis, S., Masalli, H.A., Amiroudine, M.Z.A.M, Arapoc, D.J. Antioxidant Property And Mtt Assay Screening of Local And Imported *Punica Granatum*, *Eur. Chem. Bull.* v. 11, p. 6-10, 2022. <https://doi.org/10.31838/ecb/2022.11.09.002>.

Santos, L.L.R. et al., Vitamin C and oxidative stress on cultured human keratinocytes. *The Canadian Journal of Plastic Surgery*. v. 12, n. 1, p. 17-19. 2004.

Sapra, P., Allen, T.M., Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Progress in Lipid Research*. v. 42, p. 439-462, 2003.

Saraf, A.S. 2010; Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. *Fitoterapia*. v. 81, n.7, p. 680-689. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.05.001>.

Schippmann, U., Leaman, D.J., Cunningham, A. Impact of cultivation and gathering of medicinal plants on biodiversity: Global trends and issues. In *Biodiversity and the Ecosystem Approach in Agriculture, Forestry and Fisheries*; Food and Agriculture Organization: Rome, Italy. p. 142–167. 2002.

Schmölz, L. Wallert, M. Lorkowski, S, Optimized incubation regime for nitric oxide measurements in murine macrophages using the Griess assay. *Journal of Immunological Methods*. v. 449, p. 68-70, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.06.012>.

Shaban, N.S., Tohamu, M.A., El-Banna, H.A., Radi, A.M., El-Gendy, A.A., Owis, A.I. Phytochemical and pharmacological studies of ethanolic extract of *Thymus vulgaris*. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. v. 4, n. 10, p. 1988-2001. 2015.

Shahidi, F. *Natural antioxidants chemistry, health effects, and application*; AOCS Press: Champaign, 1997.

Shahrajabian, M.H., Sun, W., Cheng, Q. Clinical aspects and health benefits of ginger (*Zingiber officinale*) in both traditional Chinese medicine and modern industry. *Acta Agric. Scand. B Soil Plant Sci*. v. 69, p. 546–556. 2019.

Shahrajabian, M.H., Sun, W., Cheng, Q. Exploring *Artemisia annua* L., artemisinin and its derivatives, from traditional Chinese wonder medicinal science. *Not. Bot. Horti Agrobot*. v. 48, p. 1719–1741. 2020.

Shankar, S.R., Rangarajan, R., Sarada, D.V.L., Kumar, C.S. Evaluation of Antibacterial Activity and Phytochemical Screening of *Wrightia tinctoria* L., *Pharmacogn. J.*, v. 2, p. 19-22. 2010. [https://doi.org/10.1016/S0975-3575\(10\)80066-5](https://doi.org/10.1016/S0975-3575(10)80066-5).

Shen, A. et al., Raman scattering properties of human pterygium tissue. *Journal of Biomedical Optics*. v. 10, n. 2, 024036, 2005. <https://doi.org/10.1117/1.1888345>.

Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., Jin, B. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chemistry*. V. 383, ID do artigo 132531. 2022.

Silva, L.P., Bonatto, C.C., Joanitti, G.A., Processo de obtenção de moléculas bioativas em sistemas carreadores micro e nanoestruturados. Brasil. WO2016119030A1. 2015.

Silva, R.A.D. *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil*. São Paulo: Nacional, 1926. 1149 p.  
Cunha, A.P. *Farmacognosia e fitoquímica*. 2 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2009. 670 p.

Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6 ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2007. 1096 p.

Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Mehta, P.K. Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. 3 *Biotech.* v. 15, p. 1-15. 2017. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0586-4>

Singh, T.R.R., Lavery, G., Donnelly, R., *Hydrogels: Design, Synthesis and Application in Drug Delivery and Regenerative Medicine*. 1° ed. CRC Press. 2018.

Sinram, R.D. Nephelometric determination of phosphorus in soybean and corn oil processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. v. 63, n.5, p. 667-670. 1986.

Sławińska-Brych, A., Mizerska-Kowalska, M., Król, S.K., Stepulak, A., Zdzisińska, B. Xanthohumol Impairs the PMA-Driven Invasive Behaviour of Lung Cancer Cell Line A549 and Exerts Anti-EMT Action. *Cells*. v. 10, n. 6, ID do artigo 1484. 2021. <https://doi.org/10.3390/cells10061484>.

Snyder, S.H. Nitric Oxide: First in a New Class of Neurotransmitters. *Science*. v. 257, n. 5067, p. 494-496. 1992. <https://doi.org/10.1126/science.1353273>.

Sofowora A. The present status of knowledge of the plants used in traditional medicine in western Africa: A medical approach and a chemical evaluation. *J Ethnopharmacol.* v. 2, p. 109–118. 1980.

Sorgi, F.L. Huang, L. Large scale production of DC-Chol cationic liposomes by microfluidization. *Int. J. Pharm.* V. 144, n. 2, p. 131-139. 1996. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(96\)04733-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(96)04733-3).

Sun, W., Shahrajabian, M.H., Cheng, Q. Natural dietary and medicinal plants with anti-obesity therapeutics activities for treatment and prevention of obesity during lock down and in post-COVID-19 era. *Appl. Sci.* v. 11, ID do artigo 7889. 2021.

Sun, W., Shahrajabian, M.H., Lin, M. Research progress of fermented functional foods and protein factory-microbial fermentation technology. *Fermentation* v. 8, ID do artigo 688. 2022.

Syed, T.A. et al., Management of psoriasis with Aloe vera extract in a hydrophilic cream: a placebo-controlled, double-blind study. *Tropical Medicine and International Health*. v. 1, n. 4, p. 505-509, 1996.

Takai, Y., Masuko, T., Takeuchi, H., Lipid structure of cytotoxic granules in living human killer T lymphocytes studied by Raman microspectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1335, p. 199–208, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(96\)00138-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(96)00138-9).

Tamilarasi, T., Ananthi, T. Phytochemical Analysis and Anti Microbial Activity of *Mimosa pudica* Linn.. *Res. J. Chem. Sci*. v. 2, n.2, p. 72-74. 2012.

Tanaka, Y., Sakaki, I., Ohkubo, T., Extraction of phospholipids from salmon roe with supercritical carbon dioxide and an entrainer. *Journal of Oleo Science*. v. 53, n. 9, p. 417-424, 2004.

Tayel, A.A., El-Sedfy, M.A., Ibrahim, A.I., Moussa, S.H. Application of *Quercus infectoria* extract as a natural antimicrobial agent for chicken egg decontamination. *RAM*. v. 4, p. 391-397. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.12.003>.

Taylor, M. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Elsevier Science & Technology, p. 57-58. 2016. ISBN 9780081013991.

Taylor, T.M., Weiss, J., Davidson, P.M., Bruce, B.D. Liposomal Nanocapsules in Food Science and Agriculture. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. v. 45, p. 587-605. 2007. <https://doi.org/10.1080/10408390591001135>.

Taylor, T.M., Weiss, J., Davidson, P.M., Bruce, B.D. Liposomal Nanocapsules in Food Science and Agriculture. *Critical Reviews in food science and nutrition*. v. 45, n. 7-8, p. 587-605. 2007. <https://doi.org/10.1080/10408390591001135>.

Tchemtchoua, V.T., Atanasova, G., Aqil, A., Filée, P., Garbacki, N., Vanhootheghem, O., Deroanne, C., Noel, A., Jérôme, C., Nusgens, B., Poumay, Y., Colige, A. Development of a Chitosan Nanofibrillar Scaffold for Skin Repair and Regeneration. *Biomacromolecules*, v. 12, n. 9, p. 3194-3204. 2011.

Thibane, V.S. Ndhlala, A.R., Finnie, J.F., Staden, J.V. Cosmeceutical efficiency by some plant extracts used traditionally for skin care in inhibiting tyrosinase activity in a human epidermal melanocyte (HEM) cell line. *S. Afr. J. Bot*. v. 126, p. 256-260. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.06.031>.

Tian, J., Ban, X., Zeng, H., He, J., Chen, Y. The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. *Plos One*. v. 7, ID do artigo e30147. 2012.

Tokumaso, F., Jin, A.J., Feigenson, G.W., Dvorak, J.A. Atomic force microscopy of nanometric liposome adsorption and nanoscopic membrane domain formation. *Ultramicroscopy*. v. 97, n. 1-4, p. 217-227. [https://doi.org/10.1016/S0304-3991\(03\)00046-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3991(03)00046-9).

Tometry, S.S., Ahmady, M., Ariaii, P., Soltani, M.S. Extraction and encapsulation of *Laurus nobilis* leaf extract with nano-liposome and its effect on oxidative, microbial, bacterial and sensory properties of minced beef. *Journal of food measurement and characterization*. v. 14, p. 3333-3344. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00578-y>.

Tran, T.M., Dai, T.X.T., Tran, D.B., Nguyen, Q.C.T. e Nguyen, D.H.Y. Um método espectrofotométrico simples para quantificar lipídios totais em plantas e animais. *Jornal CTU de Inovação e Desenvolvimento Sustentável*, v. 11, n. 2, p. 106-110. 2019. <https://doi.org/10.22144/ctu.jen.2019.030>

Trapp S., Croteau, R. Defensive Resin Biosynthesis in Conifers. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* v. 52, p. 689-724. 2001. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.689>.

Tu, Y. Ly, M., Viu, P., Huynh, T., Zhang, M., Castelli, M., Liu, Z., Huang, Q., Fan, C., Fang, H., Zhou, R., Destructive extraction of phospholipids from *Escherichia coli* membranes by graphene nanosheets. *Nature Nanotechnology*. v. 8, p. 594-601, 2003.

Ullah, N. Phytochemical Screening and Evaluation of Anesthetic Effects of Qurs saffron (A Herbal Medicine). *Asian Journal of Medical Sciences*, v. 3, n. 3, p. 131-133, 2011.

"Upadhyay, B., Singh, K.P., Kumar, A. ETHNO-MEDICINAL, PHYTOCHEMICAL AND

ANTIMICROBIAL STUDIES OF EUPHORBIA TIRUCALLI L. *J. Phytol.* v. 2, n. 4, p. 65-77. 2010. "

Van, W.B.E. Van, H.F., Van, O.B. Poisonous plants of South Africa. *Briza Public*. pp. 288. 2002.

Vashist, H., Jindal, A. Antimicrobial Activities of Medicinal Plants –Review. *Int. J. Pharm. Biomed. Sci.* v. 3, n. 1, p. 222-230. 2012.

Vater, C., Bosch, L., Mitter, A., Gols, T., Seiser, S., Heiss, E., Elbe-Burger, A., Wirth, M., Valenta, C., Klang, V. Lecithin-based nanoemulsions of traditional herbal wound healing agents and their effect on human skin cells. *Eur J Pharm Biopharm.* v. 170, p. 1-9. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.11.004>.

Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalo, C., Bezirtzoglou, E. Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future

Perspectives, Microorganisms. v. 9, ID do artigo 2041. 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102041>.

Venuprasad, M.P., Kandikattu, H.K., Razack, S., Khanum, F. Phytochemical analysis of *Ocimum gratissimum* by LC-ESI-MS/MS and its antioxidant and anxiolytic effects. *S. Afr. J. Bot.* v. 91, p. 151-158. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.02.010>.

Vichi, S., Zitterl-Eglseer, K., Jugl, M., Franz, C. Determination of the presence of antioxidants deriving from sage and oregano extracts added to animal fat by means of assessment of the radical scavenging capacity by photochemiluminescence analysis, *Nahrung.* v. 45, p. 101–104. 2001. [https://doi.org/10.1002/1521-803\(20010401\)45:2<101::AID-FOOD101>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1521-803(20010401)45:2<101::AID-FOOD101>3.0.CO;2-W).

Vilamarim, R., Bernardo, J., Videira, R.A., Valentão, P., Veiga, F., Andrade, P.B., An egg yolk's phospholipid-pennyroyal nootropic nanoformulation modulates monoamino oxidase-A (MAO-A) activity in SH-SY5Y neuronal model. *Journal of Functional Foods.* v. 46, p. 335–344, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.009>.

Vorselen, D., Piontek, M.C., Roos, W.H., Wuite, G.J.L. Mechanical Characterization of Liposomes and Extracellular Vesicles, a Protocol. *Front. Mol. Biosci.* v. 7, ID do artigo 139. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00139>.

Wagner, H., Bladt, S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas.* 2 ed. Berlin: Springer, 1996. 384 p.

Walker, G., White, N. *Introduction to fungal physiology.* Capítulo 1. Ed: Kevin Kavanagh. *Fungi: Biology and Applications*, 3 ed. 2017.

Wang, J., Chen, Y.P., Zhou, G.S., Chen, Y.Y., Mao, C.B., Yang, M.Y. Polydopamine-Coated *Antheraea pernyi* (A.*pernyi*) Silk Fibroin Films Promote Cell Adhesion and Wound Healing in Skin Tissue Repair. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* v. 11, p. 34736 – 34743. 2019.

Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., LaVoie, E.J., Huang T-C., Ho, C-T. Antioxidative Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis*), *J. Agric. Food Chem.* v. 46, p. 4869-4873. 1998. <https://doi.org/10.1021/jf980614b>.

Wang, S., Zhang, Q., Tan, B., Liu, L., Shi, L. pH-Sensitive Poly(Vinyl Alcohol)/Sodium Carboxymethylcellulose Hydrogel Beads for Drug Delivery. *Journal of Macromolecular Science, Part B.* v. 50, n. 12, p. 2307-2317. 2011.

Wang, T., Zhou, D., Advances in phospholipid quantification methods. *Current Opinion in Food Science.* v. 16, p. 15-20, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.06.007>.

Wang, X., Qi, J., Zhang, W., Pu, Y., Yang, R. Wang, P., Liu, S., Tan, X., Chi, B. 3D-printed antioxidant antibacterial carboxymethyl cellulose/ε-polylysine hydrogel promoted skin wound

repair. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 187, p. 91-104. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.115>.

Wang, Y.J., Pan, M.H., Cheng, A.L., Lin, L.I., Ho, Y.S., Hsieh, C.Y., Lin, J.K. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* v. 15, p. 1867–1876.1997.

Ware, I., Franke, K., Hussain, H., Morgan, I., Rennert, R., Wessjohann, L.A. Bioactive Phenolic Compounds from *Peperomia obtusifolia*, *Molecules*. v. 27, ID do artigo 4363. 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27144363>.

Weaver, V., Dombink, I., Dorp, C., Dormann, P. Quantification of sterol lipids in plants by quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of lipid research*. v. 52, n. 5, p. 1039-1054. 2011. <https://doi.org/10.1194/jlr.D013987>.

Weaver, V., Dormann, P., Holzl, G., Analysis and Quantification of Plant Membrane Lipids by Thin-Layer Chromatography and Gas Chromatography. *Plant Lipid Signaling Protocols*. v. 1009, p. 69-78, 2013. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-401-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-401-2_8).

Weitzman, I., Summerbell, R.C. The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 8, p. 240–259. 1995.

White, T.C., Marr, K.A., Bowden, R.A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 11, p. 382–402. 1998.

Winter, E., Pizzol, C.D., Locatelli, C., Silva, A.H., Conte, A., Chiaradia-Delatorre, L.D., Nunes, R.J., Yunes, R.A., Creckzynski-Pasa, T.B. In vitro and in vivo Effects of Free and Chalcones-Loaded Nanoemulsions: Insights and Challenges in Targeted Cancer Chemotherapies. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. v. 11, n. 10, p. 10016-10035. 2014. <https://doi.org/10.3390/ijerph111010016>.

Wolff, O., Waldvogel, S.R., Reliable protocol for the large-scale synthesis of diphenylphosphoryl azide (DPPA). *Practical Synthetic Procedures*. v. 2004, n. 8, p. 1303-1305, 2004.

Xu, X., Khan, M.A., Burgess, D.J. A two-stage reverse dialysis in vitro dissolution testing method for passive targeted liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 426, n. 1-2, p. 211- 218. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.030>.

Xu, X., Khan, M.A., Burgess, D.J. A two-stage reverse dialysis in vitro dissolution testing method for passive targeted liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 426, n. 1-2, p. 211-218. 2012.

Xu, Y., Hanna, M.A. Electrospray encapsulation of water-soluble protein with polylactide: Effects of formulations on morphology, encapsulation efficiency and release profile of particles. *Int. J. Pharm.* v. 320, p. 30-36. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.03.046>.

Yang, Y., Zhao, X., Yu, J., Chen, X., Wang, R., Zhang, M., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, S., Cheng, Y. Bioactive skin-mimicking hydrogel band-aids for diabetic wound healing and infectious skin incision treatment. *Bioactive Materials.* v. 6, n. 11, p. 3961-3975. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.04.007>.

Yoda, Y., Hu, Z-Q., Zhao, W-H., Shimamura, T. Different susceptibilities of *Staphylococcus* and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 10, n. 1, p. 55-58, 2004. <https://doi.org/10.1007/s10156-003-0284-0>.

Yu, G., Zhang, Y., Ren, W., Dong, L., Li, J., Geng, Y., Zhang, Y., Li, D., Xu, H., Yang, H. Network pharmacology-based identification of key pharmacological pathways of Yin–Huang–Qing–Fei capsule acting on chronic bronchitis. *Int. J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* v. 12, ID do artigo 85. 2017.

Zabetakis, K., Ghann, W.E., Kumar, S., Daniel, M-C. Effect of high gold salt concentrations on the size and polydispersity of gold nanoparticles prepared by an extended Turkevich–Frens method. *Gold Bulletin.* v. 45, p. 203-211. 2012. <https://doi.org/10.1007/s13404-012-0069-2>.

Zhang, J., Tao, N., Wang, M., Shi, W., Ye, B., Wang, X., Zhu, Q., Hua, C., Characterization of phospholipids from Pacific saury (*Cololabis saira*) viscera and their neuroprotective activity. *Food Bioscience.* v. 24, p. 120-126, 2018.

Zhang, X-P.; Li, Y-D.; Luo, L-L.; Liu, Y-Q.; Li, Y.; Guo, C.; Li, Z-D.; Xie, X-R.; Song, H-X.; Yang, L-P.; Sun, S-B.; An, F-Y. Astragalus Saponins and Liposome Constitute an Efficacious Adjuvant Formulation for Cancer Vaccines. *Cancer Biother. Radiopharm.* v. 33, p. 25-31. 2018. <https://doi.org/10.1089/cbr.2017.2369>.

## ANEXOS



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL  
Secretaria de Meio Ambiente  
Jardim Botânico de Brasília



### AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA Nº 007/2019

Pesquisador (a) **Tatiane de Melo Pereira**

Orientador: **Luciano Paulino da Silva**

Equipe de Apoio:  
Tatiane de Melo Pereira - 15.214.575- SSP/MG

Título: Síntese de lipossomos contendo extrato aquosos de plantas medicinais para uso tópico com propriedades anti-inflamatórias e anti-bacteriana.

#### INSTITUIÇÃO

Universidade de Brasília e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Instituto de ciências biológicas

Período  
**17/04/2019 a 17/10/2019**

Renovação: SIM

Dias da Semana

( X ) Segunda-feira ( X ) Terça-feira ( X ) Quarta-feira ( X ) Quinta-feira ( X ) Sexta-feira  
( ) Sábado ( ) Domingo

#### OBSERVAÇÕES

1. Pesquisadores estão isentos do pagamento da taxa de visitação pública durante o período da pesquisa e estão autorizados a adentrar o JBB somente pela Portaria Privativa.

Brasília - DF, 17/04/2019.

  
**LÍLIAN DE CÁSSIA SILVA BREDA**  
Superintendente Técnico-Científica  
Jardim Botânico de Brasília – JBB

1. Apresentar documento de identidade juntamente com a autorização para adentrar o JBB.
2. Durante o período de estadia no espaço do JBB e/ou da EEJBB, manter uma autorização em seu poder e outra visível no vidro do carro. A autorização de pesquisa pode ser solicitada a qualquer tempo, por qualquer servidor em exercício na instituição.



### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 74283-1	Data da Emissão: 27/02/2020 16:33:38	Data da Revalidação*: 27/02/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Tatiana de Melo Pereira	GPF: 081.038.976-13
Título do Projeto: Desenvolvimento de lipossomas vegetais com propriedades anti-inflamatórias aprisionados em hidrogéis para uso tópico	
Nome da Instituição: Fundação Universidade de Brasília	CNPJ: 00.038.174/0001-43

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta material botânico	02/2020	03/2020
2	Teste de atividade	07/2020	03/2021
3	Teste de atividade	03/2021	03/2022
4	Formulação final	03/2022	03/2023
5	Produção lipossomas e niossomas	03/2020	07/2020

#### Observações e ressalvas

1	Esta autorização NÃO exclui a necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possente ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regulamentação fundiário encontra-se em curso.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR OS DADOS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da vigência da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falta descrição de informações relevantes que subsistam a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para as fins previstas na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2016, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo realizadas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que empreguem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presentes e passadas, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas à autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a vitalidade de populações de grupo taxonômico de interesse em condições in situ.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em: <a href="http://www.cma.gov.br/legis">www.cma.gov.br/legis</a> .

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0742830120200227

Página 1/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 74283-1	Data de Emissão: 27/02/2020 16:33:36	Data de Revalidação*: 27/02/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Tatiana de Melo Pereira	CPF: 081.038.978-13
Título do Projeto: Desenvolvimento de lipossomos vegetais com propriedades anti-inflamatórias aprisionados em hidrogéis para uso tópico	
Nome da Instituição: Fundação Universidade de Brasília	CNPJ: 00.038.174/0001-43

#### Outras ressalvas

1	PARQUE NACIONAL DE BRASÍLIA A coleta no PNB deve ser precedida de um contato com a Coordenação de Gestão de Pesquisa informando-a com a antecedência mínima de uma semana da data de campo prevista, pelo e-mail Cibele.barreto@icmbio.gov.br, para troca de informações necessárias entre as partes e providências de gestão pertinentes. Os pesquisadores deverão portar cópia da autorização para acesso e permanência dentro da Unidade.	PARQUE DE BRASÍLIA
---	--	--------------------

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	PARQUE NACIONAL DE BRASÍLIA	DF	Cerrado	Não	Dentro de UC Federal

#### Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Dentro de UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtd.
1	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Mimosa pudica	-
2	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Plantago major	-
3	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Curcuma longa	-
4	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Thymus vulgaris	-
5	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Euphorbia tirucalli	-
6	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Equisetum arvense	-
7	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Artemisia alba	-
8	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Lavandula angustifolia	-

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0742830120200227

Página 2/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 74283-1	Data de Emissão: 27/02/2020 16:33:36	Data de Revalidação*: 27/02/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Tatiana de Melo Pereira	CPF: 081.038.976-13
Título do Projeto: Desenvolvimento de lipossomos vegetais com propriedades anti-inflamatórias aprisionados em hidrogéis para uso tópico	
Nome da Instituição: Fundação Universidade de Brasília	CNPJ: 00.038.174/0001-43

#### Atividades X Taxons

#	Atividade	Taxon	Qtd.
9	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	<i>Peltagonium graveolens</i>	-
10	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	<i>Tanacetum officinale</i>	-
11	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	<i>Ocimum</i>	-
12	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	<i>Symphytum officinale</i>	-
13	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	<i>Punica granatum</i>	-
14	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	<i>Zingiber officinale</i>	-
15	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	<i>Albizia arborea</i>	-
16	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	<i>Tropaeolum majus</i>	-
17	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	<i>Salvia officinalis</i>	-
18	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	<i>Artemisia absinthium</i>	-
19	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	<i>Origanum vulgare</i>	-
20	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	<i>Perilla frutescens</i>	-

#### Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Plantas)	Folhas, Rizoma, Caule, Flor, Ramos

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0742830120200227

Página 3/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 74283-1	Data da Emissão: 27/02/2020 16:33:36	Data de Revalidação*: 27/02/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Tatiane de Melo Pereira	CPF: 081.036.976-13
Título do Projeto: Desenvolvimento de lipossomos vegetais com propriedades anti-inflamatórias aptacionados em hidrogéis para uso tópico	
Nome da Instituição: Fundação Universidade de Brasília	CNPJ: 00.038.174/0001-43

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	EMBRAPA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0742830120200227

Página 4/5





Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
**Cadastro nº A078201**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A078201**  
Usuário: **Embrapa**  
CPF/CNPJ: **00.348.003/0001-10**  
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

**Espécie**

**Tropaeolum majus (Kapucinka)**  
**Ocimum gratissimum**

Título da Atividade: **PRODUÇÃO DE LIPOSSOMAS À BASE DE PLANTAS MEDICINAIS**

**Equipe**

**Luciano Paulino da Silva** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
**Tatiane de Melo Pereira** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Bolsista

Data do Cadastro: **28/10/2020 17:34:42**  
Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **17:36 de 28/10/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - **SISGEN**

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Desenvolvimento de estratégias inovadoras de imunização para viabilizar o uso de vacas como biofábricas de anticorpos neutralizantes produzidos a partir do colostro para tratamento e prevenção de doenças infecciosas em bezerros e humanos", protocolada sob o CEUA nº 1915290721 (ID 000365), sob a responsabilidade de **Wanessa Araújo Carvalho e equipe; Mariana Magalhães Campos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (CEUA/EGL) na reunião de 22/09/2021.

We certify that the proposal "Development of innovative immunization strategies to enable the use of cows as bio-factories of colostrum neutralizing antibodies for treatment and prevention of infectious diseases in calves and humans", utilizing 30 Bovines (30 females), protocol number CEUA 1915290721 (ID 000365), under the responsibility of **Wanessa Araújo Carvalho and team; Mariana Magalhães Campos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Embrapa Gado de Leite Corporate (CEUA/EGL) in the meeting of 09/22/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 09/2021 a 09/2023 Área: **Núcleo de Saúde Animal E Qualidade do Leite**

Origem: **Campo Experimental José Henrique Bruschi**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **4 a 10 anos**

Quantidade: **30**

Linhagem: **Holandesa**

Peso: **450 a 900 kg**

Juiz de Fora, 10 de outubro de 2023

Dr. Rui da Silva Verneque  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Embrapa Gado de Leite

Maria Izabel Carneiro Ferreira  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Embrapa Gado de Leite



