

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Jaqueline Bandeira Rubenick

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO
MUPIROCINA E ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM:
CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBIOFILME**

Santa Maria, RS
2017

Jaqueline Bandeira Rubenick

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO MUPIROCINA E ÓLEO
ESSENCIAL DE ALECRIM: CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBIOFILME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Clarice Madalena Bueno Rolim

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bandeira Rubenick, Jaqueline
DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO MUPIROCINA E
ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM: CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
ANTIBIOFILME / Jaqueline Bandeira Rubenick.- 2017.
89 p.; 30 cm

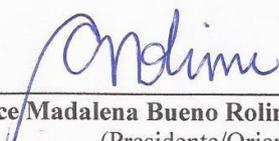
Orientadora: Clarice Madalena Bueno Rolim
Coorientadora: Daniele Rubert Nogueira Librelotto
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2017

1. Nanotecnologia 2. Método analítico 3. Atividade
antibiofilme I. Madalena Bueno Rolim, Clarice II.
Rubert Nogueira Librelotto, Daniele III. Título.

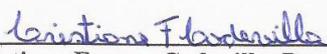
Jaqueline Bandeira Rubenick

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO MUPIROCINA E
ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM: CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
ANTIBIOFILME**

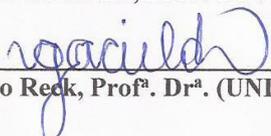
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.



Clarice Madalena Bueno Rolim, Prof^ª. Dr^ª. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Cristiane Franco Codevilla, Prof^ª. Dr^ª. (UFSM)



Virginia Cielo Reck, Prof^ª. Dr^ª. (UNIFRA)

Santa Maria, 24 de março de 2017.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, em especial ao meu amado esposo Alexandre Machado Rubim e aos meus pais, Sandra Bandeira Rubenick e Ernei Derli Rubenick.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pela confiança depositada e pela paciência nos momentos em que me fiz ausente. Ao meu esposo que sempre esteve ao meu lado me apoiando, dando força e incentivando.

Também gostaria de agradecer ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial a minha orientadora Clarice Madalena Bueno Rolim pela oportunidade que me foi dada e confiança depositada durante esse período. A minha co-orientadora Daniele Rubert Nogueira Librelotto pela disponibilidade e auxílio nas horas necessárias.

Agradeço ao Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Franciscano, em especial ao Doutorando Leonardo Lopes pela parceria e apoio nas análises microbiológicas. A Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia dos Alimentos, Bruna Klein pelo auxílio nas análises por cromatografia gasosa. Aos professores Roberto Christ Vianna Santos e Roger Wagner.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO MUPIROCINA E ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM: CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBIOFILME

AUTOR: Jaqueline Bandeira Rubenick

ORIENTADORA: Clarice Madalena Bueno Rolim

CO-ORIENTADORA: Daniele Rubert Nogueira Librelotto

A mupirocina é um antibiótico de uso consolidado no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA). A incorporação de produtos naturais com atividade farmacológica, como os óleos essenciais, torna-se uma alternativa frente a crescente resistência de micro-organismos aos tratamentos terapêuticos convencionais. O presente estudo teve como objetivo produzir e avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanocápsulas de mupirocina e óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (óleo essencial de alecrim) frente a estirpes de *Staphylococcus aureus* (ATCC 00039, ATCC 33691 e isolado clínico). As suspensões de nanocápsulas contendo mupirocina, óleo essencial de alecrim e estes em associação foram preparadas utilizando o método de deposição interfacial de polímero pré-formado. Um método de cromatografia a líquido de alta eficiência foi adaptado da USP 2012 para a quantificação da mupirocina nas formulações. Este método mostrou-se linear, específico, exato, preciso e robusto. As formulações foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e taxa de associação, apresentando valores aceitáveis e dentro do esperado para a finalidade pretendida. O óleo essencial de alecrim (OEA) foi caracterizado através de cromatografia gasosa (GC-FID e GC/MS) e apresentou como componentes majoritários cânfora (40,33%), 1,8-cineol (36,04%) e α -pineno (10,45%). A nanoencapsulação do OEA apresentou resultados melhores em comparação ao OEA na sua forma livre no ensaio que determina a concentração inibitória mínima (CIM). Quando OEA e MUP foram associados e nanoencapsulados, percebeu-se uma melhora na atividade do óleo e do fármaco para a ATCC 00039. Na determinação da concentração mínima de erradicação do biofilme, as concentrações que apresentaram redução no biofilme foram superiores em comparação aos resultados encontrados no CIM. No ensaio de citotoxicidade, as amostras em concentrações de até 10 $\mu\text{g/mL}$, apresentaram viabilidade celular superior a 80%, tanto para cultivo de fibroblastos da linhagem 3T3 quanto de queratinócitos da linhagem HaCaT. Sendo assim, as técnicas e as formulações utilizadas neste trabalho revelaram-se como ferramentas importantes no estudo de desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas e apresentam potencial de aplicação clínica.

Palavras-chave: Mupirocina. *Rosmarinus officinalis*. Nanoencapsulação. Antibiofilme.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF NANOCAPSULES CONTAINING MUPIROCIN AND ROSEMARY ESSENTIAL OIL: CHARACTERIZATION AND ANTIBIOFILM ACTIVITY

AUTHOR: Jaqueline Bandeira Rubenick
ADVISOR: Clarice Madalena Bueno Rolim
CO ADVISOR: Daniele Rubert Nogueira Librelotto

Mupirocin is a commonly used antibiotic in the treatment of infections caused by methicillin resistances *staphylococcus aureus* (MRSA). The incorporation of natural products with pharmacologic activity like essential oils becomes an alternative to increasing resistance of microorganisms to conventional therapeutics treatment. The present study aimed to produce and evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of nanocapsules of mupirocin and *Rosmarinus officinalis* essential oil (Rosemary essential oil) to the stirpes of *staphylococcus aureus* (ATCC00039, ATCC 33691 and clinical isolated). The nanocapsules suspensions containing mupirocin, Rosemary essential oil and these in association were prepared using the interfacial deposition of preformed polymer method. A method of High Performance Liquid Chromatography was adapted of USP 2012 to quantification of mupirocin in formulations. This method is linear, specific, accuracy, precise and robust. The formulations were characterized for mean particle diameter, polydispersity index, zeta potential, pH and association rate, presenting values acceptable and within the expected for intended purpose. Rosemary essential oil (REO) was characterized by gas chromatography (GC-FID and GC-MS) and presented like major compounds camphor (40.33%), 1,8-cineole (36.04%) and α -pinene (10.45%). Nanoencapsulation of the REO presented better results in compared to REO in its free form in the assay that determines the minimum inhibitory concentration (MIC). When REO and MUP were associated and nanoencapsulated, there was an improvement in the activity of the oil and the drug for ATCC 00039. In the determination of minimum concentration of biofilm eradication, the concentrations that presented reduction in the biofilm were higher in comparison to the results found in the MIC. In the cytotoxicity assay, samples at concentrations up to 10 $\mu\text{g/mL}$, showed cell viability greater than 80%, both for culture of fibroblasts of the 3T3 lineage and of keratinocytes of the HaCaT strain. Thus, the techniques and formulations used in this work have proved to be important tools in the study of the development of new antimicrobial therapies and presented potential for clinical application.

Key words: Mupirocin. *Rosmarinus officinalis*. Nanoencapsulation. Antibiofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura química da mupirocina.....	17
Figura 2 –	Planta medicinal <i>Rosmarinus officinalis</i>	18
Figura 3 –	Processo de formação do biofilme.....	21
Figura 4 –	Ilustração de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	23
Figura 5 –	Espectros na região do infravermelho obtidos a partir de: SQR de mupirocina (A) e mupirocina matéria-prima (B), preparados em pastilhas de KBr.....	26
Figura 6 –	Termograma da mupirocina matéria-prima.....	27

ARTIGO 1

Figura 1 –	Chromatograms corresponding to: (A) solution of MUP reference substance, (B) Nanocapsules of MUP and caprylic/capric triglyceride oil, (C) Nanocapsules of MUP and rosemary oil, (D) Unloaded nanocapsules of rosemary oil and (E) unloaded nanocapsules of caprylic/capric triglyceride oil.....	37
Figura 2 –	Chromatograms corresponding to: (A) solution of MUP time 24 hours after acid hydrolysis, (B) solution of MUP time 24 hours after basic hydrolysis and (C) solution of MUP time 24 hours after photolytic conditions.....	38
Figura 3 –	Analytical curve of MUP.....	38

ARTIGO 2

Figura 1 –	Teste de inchamento de polímero.....	59
Figura 2 –	Cromatograma obtido com o óleo essencial de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>), e seus componentes majoritários.....	61
Figura 3 –	Cromatogramas referentes ao OEA (<i>Rosmarinus officinalis</i>), óleo extraído da NCOEA e da NCMUPOEA no tempo zero dias.....	63
Figura 4 –	Gráficos demonstrativos da atividade antibiofilme encontrada utilizando as amostras em concentrações de CIM, 2x CIM e 3x CIM.....	65
Figura 5 –	Viabilidade celular das diferentes amostras em fibroblastos da linhagem 3T3.....	66
Figura 6 –	Viabilidade celular em linhagem HaCaT de queratinócitos humano.....	66

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 –	Parameters and variations to evaluate the robustness of the chromatography method.....	35
Tabela 2 –	Values obtained for the intermediate precision determination for MUP-loaded polymeric nanocapsules with rosemary oil.....	39
Tabela 3 –	Values obtained for the intermediate precision determination for MUP-loaded polymeric nanocapsules with rosemary oil.....	40
Tabela 4 –	Combinations tested to evaluate the robustness, evaluating condition 1.....	41
Tabela 5 –	Combinations tested to evaluate the robustness, evaluating condition 2.....	41
Tabela 6 –	Physical-chemical characteristics of nanocapsules of MUP and rosemary oil (NCRM), nanocapsules of MUP and caprylic/capric triglyceride oil (NCMT), unloaded nanocapsules of rosemary (BNCR) and unloaded nanocapsules of caprylic/capric triglyceride (BNCT).....	42
Tabela 7 –	Physical-chemical characteristics after stability test of polymeric nanocapsules at room temperature and 40 °C.....	43

ARTIGO 2

Tabela 1 –	Características físico-químicas das nanocápsulas de mupirocina e óleo essencial de alecrim (NCMUPOEA), nanocápsulas de óleo essencial de alecrim (NCOEA) e nanocápsulas brancas (NCB)	60
Tabela 2 –	Análise qualitativa do OEA e quantidade percentual relativa dos principais compostos identificados.....	60
Tabela 3 –	Valores percentuais dos componentes majoritários do OEA encontrados nas nanocápsulas em comparação ao OEA (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	62
Tabela 4 –	- Valores da CIM (g/mL) para as diferentes estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> frente ao óleo essencial de alecrim (OEA), nanocápsula contendo o óleo (NCOEA), nanocápsula contendo óleo e mupirocina (NCMUPOEA), nanocápsula branca (NCB) e mupirocina livre (MUP)	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral.....	14
2.2	Objetivos específicos.....	14
3	REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1	Mupirocina.....	16
3.2	Óleo essencial de alecrim.....	17
3.3	Biofilme.....	20
3.4	Nanotecnologia.....	22
4	CARACTERIZAÇÃO DA MUPIROCINA MATÉRIA-PRIMA	25
Artigo 1	Preparation of mupirocin-loaded polymeric nanocapsule using essential oil of Rosemary.....	28
Artigo 2	Atividade antibiofilme de nanocapsulas poliméricas contendo mupirocina e óleo essencial de alecrim.....	50
5	DISCUSSÃO GERAL	71
6	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

O aumento da incidência de micro-organismos multirresistentes e a falta de opções para o tratamento das infecções causadas por essas bactérias reforçam a importância de medidas preventivas para evitar a sua disseminação (BOUCHER et al., 2009). Fatores como internações prolongadas, realização de procedimentos invasivos, internações em unidades de terapia intensiva, utilização de antibióticos de amplo espectro e utilização de antibióticos por tempo prolongado, contribuem para o desenvolvimento da resistência bacteriana (VONBERG et al., 2008).

A meticilina, uma penicilina semissintética, foi introduzida como um antibacteriano em 1960. Um ano após sua introdução, amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) foram identificadas. Já em meados dos anos noventa, com a emergência de cepas de MRSA, estes já se tornavam um dos mais importantes patógenos nosocomiais em todo o mundo (DERESINSKI, 2005). Como forma de defesa, micro-organismos capazes de causar infecções em implantes hospitalares como próteses e cateteres, se aderem a superfícies abióticas e formam biofilme (DOUGLAS, 2003; MICELI et al., 2011). O crescimento desses micro-organismos está fortemente associado a um importante aumento na resistência aos antimicrobianos, fazendo com que cientistas desenvolvam modelos de ensaios de biofilmes a fim de estudar o perfil de susceptibilidade dessas comunidades microbianas frente a esses fármacos (REIMAGE et al., 2009).

A mupirocina é um antibiótico muito utilizado no tratamento de infecções superficiais de pele, possui uma alta atividade contra *Staphylococcus* e *Streptococcus*, além de ser utilizado para controlar a propagação de MRSA (SUTHERLAND et al., 1985). No entanto, relatos de um aumento na resistência à mupirocina causam preocupação. Esta resistência torna-se evidente principalmente em ambientes hospitalares, onde profissionais encontram-se envolvidos em esforços para o controle de infecções causadas por MRSA. Com a crescente resistência a este antibiótico, ocorre uma redução significativa na probabilidade de erradicação desses micro-organismos (POOVELIKUNNEL; GETHIN; HUMPHREYS, 2015).

A descoberta de compostos terapeuticamente úteis que são inibidores desses processos de resistência e antibacterianos, poderiam melhorar o tratamento e a eliminação dessas cepas (OLUWATUYI; KAATZ; GIBBONS, 2004). Neste contexto, o uso de óleos essenciais vem sendo cada vez mais incluído em pesquisas para desenvolvimento de novas terapias

medicamentosas, visto que são alternativas naturais e biodegradáveis, geralmente apresentam baixa toxicidade aos mamíferos e podem atuar sobre várias moléculas-alvo ao mesmo tempo (FIGUEIREDO et al., 2008). A atividade dos óleos essenciais inclui ação antisséptica, antiviral, antimicrobiana, antioxidante, entre outras (BURT, 2004). O óleo essencial de alecrim é constituído principalmente de monoterpenos, apresentando potencial atividade antifúngica e inibitória sobre o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (BAI et al., 2010).

A crescente resistência de bactérias, vírus, fungos e parasitas a diferentes agentes antimicrobianos torna-se um desafio para o campo médico. Portanto, existe uma necessidade permanente de procurar novos antimicrobianos e novas tecnologias, destacando-se o uso de óleos essenciais e formulações de base nanotecnológica (RAI et al., 2017).

A nanotecnologia integra uma ciência multidisciplinar que possui várias aplicabilidades. Sendo assim, inúmeros estudos estão sendo realizados empregando essa tecnologia e comprovando uma melhora na atividade de fármacos e óleos essenciais (FLORES et al., 2013; KÜLKAMP et al., 2009; SAGAVE et al., 2015; SELLEM et al., 2009;). Nanocarreadores de fármacos incluem uma ampla gama de sistemas, dentre elas as nanocápsulas (NC) e as nanoesferas (NE). As NC destacam-se em relação a outros nanocarreadores pela sua alta eficiência para encapsulação de fármacos lipofílicos (SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010). Além disso, as NC podem vetorizar o ativo encapsulado ao seu sítio de ação específico, melhorar a estabilidade dos fármacos ou reduzir a degradação do ativo frente à luz, ao oxigênio e a outros componentes químicos e/ou enzimáticos, e também diminuir a irritação causada pelas substâncias ativas ao tecido, já que a parede polimérica reduz esse contato com o fármaco (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Neste contexto, esse trabalho se mostra inovador ao associar mupirocina e o óleo essencial de alecrim em nanocápsulas poliméricas, tendo como objetivo propor formulações mais eficazes para combater a resistência de diversas cepas microbianas quando em biofilmes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi desenvolver e caracterizar nanocápsulas poliméricas contendo mupirocina e óleo essencial de alecrim, bem como avaliar sua atividade frente a estirpes de *Staphylococcus aureus* formadores de biofilme.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar por espectroscopia no infravermelho e calorimetria exploratória diferencial a matéria-prima mupirocina;
- Caracterizar por cromatografia gasosa o óleo essencial de alecrim;
- Preparar nanocápsulas contendo mupirocina e óleo essencial de alecrim em associação, utilizando o método de deposição interfacial do polímero pré-formado;
- Caracterizar as diferentes formulações quanto ao diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e taxa de associação;
- Desenvolver e validar método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção ultravioleta para a quantificação de mupirocina nas suspensões de nanocápsulas;
- Avaliar a estabilidade das formulações em temperatura ambiente e em temperatura elevada (40°C);
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do fármaco, do óleo e das formulações, utilizando as linhagens celulares 3T3 (fibroblastos murinos) e HaCaT (queratinócitos humanos), e o ensaio de viabilidade celular MTT;
- Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana e antibiofilme das formulações através das técnicas de microdiluição e formação de biofilmes em placas de poliestireno de 96 poços, utilizando estirpes de *Staphylococcus aureus* (ATCC 00039, ATCC 33691 e isolado clínico).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MUPIROCINA

Conhecida quimicamente por 9-[[[3-metil-1-oxo-4-]terahidro-3,4-dihidroxi-5-[[3-(2-hidroxi-1-metilpropil)oxiranyl]metil]-2H-piran-2-il]-2-butenil]oxi]-[2s- α (E),3 β ,4 β ,5 α [2R*, 3R*(1R*,[2R]])-(E)-(2S,3R,4R,5S)-5-[(2S,3S,4S,5S)-2,3-epoxi-5-hidroxi- β -metil-2H-priman-2-ácido crotonico, éster com ácido 9-hidroxinonanoico, a mupirocina (Figura 1) é um pó branco e cristalino, levemente solúvel em água, solúvel em acetona e diclorometano. Produzido pela fermentação da cultura de *Pseudomonas fluorescens*, possui importante atividade contra cocos Gram-positivos (incluindo cepas resistentes à meticilina) e contra alguns micro-organismos Gram-negativos.

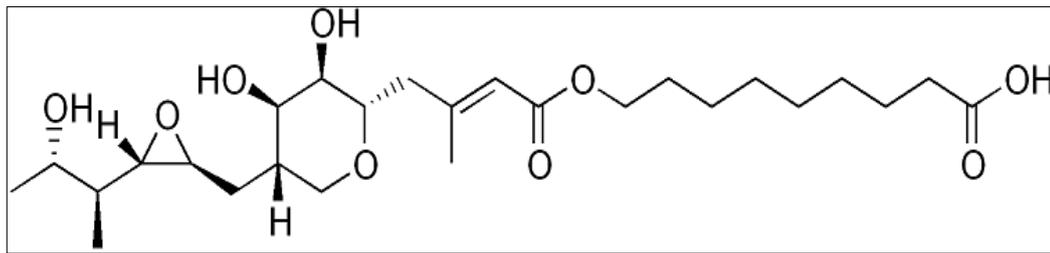
Sua estrutura química formada por uma cadeia lateral de ácidos graxos, ligada ao ácido mônico por uma ligação do tipo éster, mimetiza o esqueleto carbônico da isoleucina, competindo com esse aminoácido pelo sítio ativo da isoleucil-tRNA-sintetase bacteriana. A consequência dessa inibição competitiva é a não incorporação deste aminoácido à cadeia polipeptídica nascente, interrompendo a síntese proteica bacteriana (KOROLKOVAS, 2011; MARTINDALE, 2011; THOMAS et al.,2010).

Disponível comercialmente nas formas de pomada e creme dermatológico, a mupirocina apresenta uma baixa toxicidade e pouca atividade contra micro-organismos da microbiota saprófita da pele como micrococos, corinebactérias e *Propionibacterium* spp., que participam do mecanismo de defesa natural contra infecções dermatológicas (BRASIL 2015; SUTHERLAND et al., 1985). Após a aplicação tópica, a absorção sistêmica da mupirocina é mínima (menos de 1%). A penetração nas camadas mais profundas da derme e epiderme ocorre em peles lesionadas e sob curativos oclusivos. Sua metabolização origina o ácido mônico, um metabólito inativo, sem ação antimicrobiana (BAINES et al., 1984; KOROLKOVAS, 2011; SIMPSON et al.,1985).

A mupirocina é comercializada na concentração de 2%, sendo que a primeira forma farmacêutica a ser lançada no mercado foi pomada (Bactroban®, GlaxoSmithKline) contendo como base o polietilenoglicol. O uso desta base é desaconselhado em mucosas ou em lesões que não apresentam a pele íntegra e em feridas abertas ou queimaduras de pacientes com insuficiência renal, devido a sua ação irritativa e ao potencial nefrotóxico do polietilenoglicol absorvido (BRUNS et al., 1982). Já um segundo produto contendo mupirocina (Bactroban

nasal[®], GlaxoSmithKline), contém ingredientes inativos como a parafina e uma mistura de ésteres de glicerina. Produtos como este, são eficazes, seguros, bem tolerados pelos pacientes, permitem o uso em mucosas, feridas, queimaduras e impetigos até mesmo em pacientes com nefropatias (REAGAN et al., 1991).

Figura 1- Estrutura química da mupirocina (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012).



O produto, na sua forma acabada, deve ser conservado em temperatura ambiente e protegido da luz. Deve ser administrado através de uma fina camada sobre a área afetada, até três vezes ao dia. Recomenda-se que o tempo de tratamento não ultrapasse dez dias (KOROLKOVAS, 2011; MUPIROCINA, 2013). Considerado o melhor antimicrobiano disponível para uso tópico, este fármaco vem sendo utilizado clinicamente desde 1985, com o objetivo de eliminar carreadores nasais de *S. aureus* em ambientes hospitalares, controlando assim a disseminação deste patógeno e diminuindo o risco de infecções estafilocócicas nestes ambientes (COATES; BAX; COATES, 2009; ELTRINGHAM, 1997; SIMOR; DANEMAN, 2009).

3.2 ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM

Os óleos essenciais são difundidos há séculos, de maneira significativa, como flavorizantes, na fabricação de perfumarias e cosméticos, e farmacologicamente com fins medicinais, o que tem estimulado a procura por substâncias biologicamente ativas e eficazes, especialmente sobre micro-organismos (FIGUEIREDO et al., 2008). Além disso, a utilização de óleos essenciais de plantas tem sido também o foco de indústrias agroalimentares, atuando contra bactérias patogênicas que causam deterioração dos alimentos durante o armazenamento, transporte e prazo de validade. Essa atividade frente a diversos tipos de bactérias vem sendo

atribuída aos compostos terpenoides presentes no óleo essencial (BURT, 2004; MANGENA; MUYIMA, 1999; SMITH-PALMER et al., 2001).

A caracterização química dos óleos essenciais (OE) pode ser obtida por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, sendo que alguns óleos podem apresentar mais de 60 compostos diferentes. Algumas vezes, os componentes majoritários podem chegar a representar mais de 85% do total, enquanto outros compostos aparecem em quantidades muito menores (GALINDO et al., 2010).

Rosmarinus officinalis (Figura 2), comumente conhecido como alecrim, é amplamente utilizado nos países do Mediterrâneo, de onde se origina, e popular em muitos países ocidentais. Possui porte subarborescente lenhoso, ereto, ramificado de até 1,5 metros de altura. Suas folhas são lineares, muito aromáticas e suas flores são pequenas, azul-claro e de aroma muito agradável. Apresenta uma longa lista de alegações referentes a seus usos medicinais, incluindo ação antimicrobiana e propriedades antioxidantes, devido à presença de diterpenos fenólicos (CAMPO et al., 2000; FLAMINI et al., 2002; LORENZI; MATOS, 2002; OZCAN, 2003).

Figura 2- Imagem da planta medicinal *Rosmarinus officinalis* (Alecrim).



FONTE: <http://www.stuartxchange.com/Romero.html>

O óleo essencial de alecrim (OEA) é um líquido incolor ou levemente amarelado-esverdeado, apresenta odor forte característico e sabor aromático, canforáceo e amargo. Deve ser armazenado ao abrigo da luz e do calor, em recipientes de vidro hermeticamente fechados (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Pode apresentar variações em sua atividade antimicrobiana e antioxidante, estas variações estão associadas com a composição química

variável do óleo essencial. Fatores incluindo o local de origem, o tempo da colheita, o estágio de desenvolvimento das plantas e o método de extração, influenciam na eficácia dessas propriedades (CELIK TAS et al., 2007; JAMSHIDI; AFZAL; AFZALI, 2009; RAMIREZ et al., 2006; RUBERTO; BARATA, 2000). De acordo com Napoli e colaboradores (2010), este óleo essencial pode ser classificado segundo a visão química, em três quimiotipos: *cineoliferum* (alto teor de 1,8-cineol); *camphoriferum* (cânfora > 20%); e *verbenoniferum* (verbenona > 15%).

Segundo Flamini e colaboradores (2002), devido à presença de diterpenos fenólicos, o OEA é amplamente utilizado na indústria alimentícia como aromatizante e conservante. Bomfim e colaboradores (2015) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de OEA frente ao fungo *Fusarium verticillioides*, isolado a partir de resíduo de milho utilizado em alimentação animal. Em uma concentração de 150 µg/mL houve uma redução significativa no crescimento deste fungo. Em 300 µg/mL, através de análises microscópicas, perceberam-se alterações morfológicas significativas do fungo, tais como a ruptura da parede celular e vazamento do citoplasma. Também nessa concentração, houve uma inibição significativa da produção de ergosterol e fumonisinas, demonstrando a eficácia do OEA como um agente antifúngico.

Já em um estudo *in vitro* voltado para a avaliação farmacológica do óleo, Barreto e colaboradores (2014), investigaram se o OEA seria capaz de potencializar a atividade antibacteriana dos aminoglicosídeos contra *S. aureus* e *E. coli* resistentes a estes antibióticos, bem como, a atividade de antifúngicos contra diferentes espécies de *Candida*. Este estudo relata uma atividade antibacteriana moderada do OEA isolado, contra *S. aureus*, *E. coli*, *C. krusei*. No entanto, a associação do óleo com os aminoglicosídeos fez com que ocorresse um aumento da atividade contra cepas MDR (multirresistentes) de *S. aureus*, *E. coli*, mas este efeito não foi observado para cepas padrão (*S. aureus* ATCC25923 e de *E. coli* ATCC10536). Isso se justificaria, possivelmente, devido à ausência de mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos, já que tem sido sugerido que os produtos vegetais podem aumentar a atividade destes contra *E. coli* resistentes a múltiplos fármacos, possivelmente por interferir nos sistemas de efluxo (COUTINHO et al., 2010).

Segundo González-Lamothe e colaboradores (2009), produtos do metabolismo secundário acumulados pelas plantas podem atuar como potencializadores da atividade antibacteriana, favorecendo a ação de antibióticos com atividade limitada por mecanismos de multirresistência desenvolvidos pelos micro-organismos, ou como atenuantes de virulência, fazendo com que o hospedeiro adeque a resposta do sistema imune frente à infecção.

Por mais que vários produtos do metabolismo secundário das plantas exerçam alguma ação antibacteriana, a maior parte destas substâncias apresentam atividade fraca e espectro de

ação limitado quando utilizadas sozinhas. No entanto, ao serem combinadas entre si ou com antibióticos, podem apresentar um efeito sinérgico, modificando a resistência de certas bactérias frente a alguns fármacos, podendo levar a uma redução da dosagem necessária de antibióticos para um resultado eficaz (SIMÕES et al., 2009). A prática da combinação de substâncias vem desde sistemas medicinais antigos como na Medicina Tradicional Chinesa, objetivando o sinergismo. Combinações entre óleos essenciais são utilizadas na aromaterapia, e até mesmo a Organização Mundial de Saúde recomenda o uso de alguns medicamentos alopáticos de forma combinada (VAN VUUREN; VILJOEN, 2011).

3.3 BIOFILME

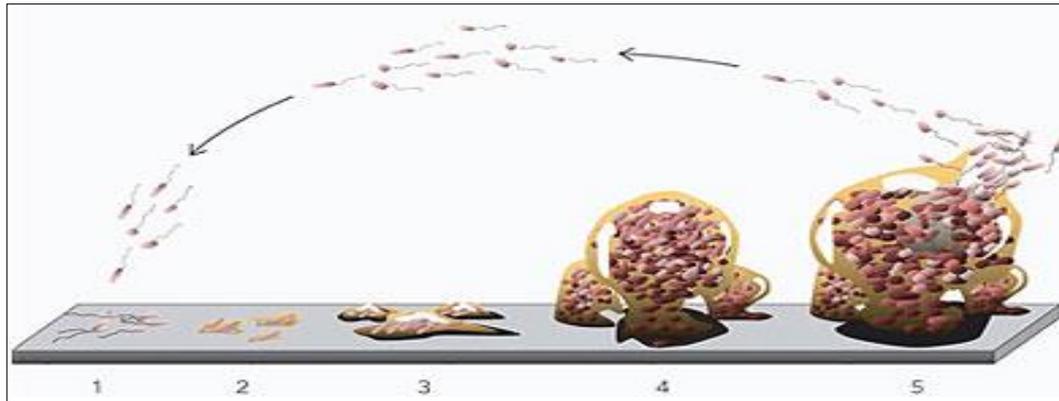
O uso abusivo de antimicrobianos apresenta como consequência o surgimento de efeitos adversos mais agressivos, tratamentos mais onerosos e a resistência microbiana. Esta resistência refere-se às cepas de micro-organismos que são capazes de multiplicar-se mesmo na presença de concentrações elevadas de antimicrobianos. Segundo o Ministério da Saúde, dos micro-organismos que causam infecções hospitalares no Brasil, mais de 70% são resistentes ao menos a um agente antimicrobiano, enquanto que das infecções microbianas em humanos, em torno de 80% estão relacionadas a biofilmes (RICHARDS et al., 2008).

Biofilmes são comunidades microbianas complexas, onde os micro-organismos estão ligados em uma superfície inerte ou viva, constituindo um modo de crescimento protegido que proporciona um grande número de vantagens quando comparados com os que se encontram de modo livre (DUNNE, 2002). O grande problema do biofilme ocorre devido ao fato que estas estruturas podem ser de 10 a 100 vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que as células não fixas (TOMIHAMA; NISHI; ARAI, 2007).

Na figura 3, está demonstrado o processo coordenado de eventos que envolvem a formação do biofilme. Inicialmente, ocorre a adesão microbiana à superfície através de fatores biológicos e não biológicos (forças de Van der Waals, interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio), o que chamamos de adesão primária. Logo após, acontece a produção de exopolissacarídeos formando complexos com os materiais da superfície onde aderem e/ou ligação com receptores específicos das paredes celulares, o que caracteriza a adesão secundária. Após este estágio, inicia-se o processo de maturação do biofilme onde canais de água permitem a entrada de nutrientes. Em seguida, o biofilme atinge uma massa crítica, estabelecendo um equilíbrio dinâmico onde o crescimento de células é compensado pela liberação de outras

(células planctônicas), que se tornam disponíveis para a colonização de outras superfícies formando novos biofilmes (COSTERTON et al., 1995; DUNNE, 2002; PROSSER et al., 1987).

Figura 3- Processo de formação de biofilme. 1) Fixação à superfície da célula ou substrato. 2) Fase de adesão e produção de Exopolissacarídeos (EPS). Em seguida, demonstrado nas etapas: 3-4, a arquitetura do biofilme se desenvolve. 5) Formação de massa crítica ocorrendo a liberação de células e/ou fragmentos do biofilme que podem colonizar/infectar outro local.



Fonte: <http://www.faba.org.ar/fabainforma/492/ABCL.htm>

Este processo torna o biofilme altamente resistente a alterações de temperatura, pH e à atividade dos antibióticos, levando a crer que essa pode ser a razão de infecções crônicas persistentes e refratárias a tratamentos clínicos. A utilização de implantes médicos invasivos como cateteres intravenosos e urinários, próteses ortopédicas, entre outros, também está associada à formação dos chamados biofilmes (DONLAN, 2001).

Pádua e colaboradores (2009) realizaram um estudo a fim de reproduzir um método capaz de evidenciar a presença de biofilmes em pacientes com rinossinusite crônica com poliposenasossinusal. Amostras de tecido da bula etmoidal de nove pacientes sem resposta ao tratamento clínico, submetidos à cirurgia, foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. Não foram realizadas culturas microbiológicas nas amostras coletadas, pois a presença de biofilme foi detectada através das fotomicrografias. Neste estudo, observou-se a presença de biofilme em 55,56% dos pacientes, ressaltando a importância de avaliar as formas atuais de tratamento da rinossinusite crônica. Além dessa patologia, estudos já demonstraram a formação de biofilme bacteriano em otite média crônica purulenta, prostatite, osteomielites, endocardite bacteriana, fibrose cística, pneumonia e tonsilites crônicas (POST et al., 2004).

Recentemente, a atividade antimicrobiana e antibiofilme *in vitro* de nanopartículas contendo o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foram avaliadas. Neste estudo, também foi

verificado a capacidade de formação de biofilmes e mensurados os níveis de exopolissacarídeos e proteínas nos biofilmes formados. Os resultados obtidos mostraram que a administração de óleo ou das nanopartículas de óleo de *M. alternifolia* representou uma redução significativa do biofilme formado por todas as espécies de *Candida* utilizadas, bem como uma redução nos níveis de proteínas e exopolissacarídeos dos biofilmes (SOUZA, 2014).

A resistência clínica a antimicrobianos tem feito com que microbiologistas, que antes direcionavam seus estudos a bactérias em sua forma planctônica, aumentem seu interesse no comportamento de colônias de bactérias aderidas a superfícies produzindo biofilmes. O Centro Americano de Controle e Prevenção de Doença, em publicações recentes, estimou que cerca de 65% de todos os processos infecciosos bacterianos crônicos, em humanos, envolveriam biofilmes (DONLAN, 2002; FERGIE et al., 2004; POTERA, 1999).

3.4 NANOTECNOLOGIA

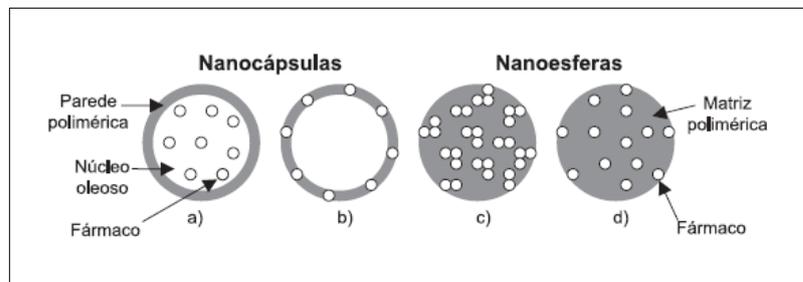
Com o objetivo de otimizar as características físico-químicas de fármacos, diferentes inovações tecnológicas estão sendo desenvolvidas, e entre elas está a nanotecnologia, com seus sistemas apresentando dimensões situadas entre 10 e 1000 nm (COUVREUR et al., 2002). Estes sistemas, por sua vez, possuem a capacidade de promover a liberação controlada e melhorar a estabilidade de fármacos, assim como carrear estas substâncias para locais mais específicos, o que culmina muitas vezes em um aumento na eficácia do tratamento e uma considerável redução nos efeitos adversos. Diversos materiais são utilizados na produção de nanoestruturas e estes irão determinar o tipo de fármaco a ser incorporado, as diferentes propriedades e características de liberação do mesmo (VAUTHIER et al., 2003; PUTHETI et al., 2008; SCHAFFAZICK et al., 2003).

A liberação do princípio ativo por meio desses sistemas ocorre por dois mecanismos primários. Um dos mecanismos é a difusão, onde o fármaco encapsulado é dissolvido e difundido para fora do polímero; o outro é a erosão, caracterizado pela degradação natural do polímero através da hidrólise das ligações ésteres, liberando assim o fármaco (FAROKHZAD; LANGER, 2006; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Para a preparação de nanopartículas, podem ser utilizados polímeros biodegradáveis como o polilático (PLA), poliglicólico (PGA) e seus co-polímeros (PLGA), policaprolactona (PCL) e os poliacrilatos, ou polímeros não biodegradáveis. Por serem biodegradáveis e biocompatíveis, os poliésteres (PLA, PGA e PLGA) são os mais utilizados para preparação de sistemas de liberação controlada de fármacos (ABDELWAHED et al., 2006).

Quando aplicado a sistema de liberação controlada de fármacos, o termo nanopartículas refere-se a dois tipos de estruturas que diferem-se na organização estrutural, são as chamadas nanoesferas e nanocápsulas (Figura 4). Sistemas onde o fármaco encontra-se disperso ou solubilizado na matriz polimérica, formando um sistema monolítico, não podendo ser identificado um núcleo diferenciado, são chamados de nanoesferas. Já as nanocápsulas, constituem um sistema reservatório onde é possível identificar um núcleo diferenciado. Nesse caso, o fármaco pode estar dentro do núcleo interno ou disperso na membrana polimérica (LIMAYEM et al., 2004; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Figura 4- Desenho ilustrativo representando nanocápsulas e nanoesferas poliméricas. Adaptado de SCHAFFAZICK et al., 2003.



O desenvolvimento de nanopartículas como sistema de liberação controlada de fármacos com fins terapêuticos recebe cada vez mais a atenção da comunidade científica. Sistemas como estes podem prevenir a degradação enzimática do fármaco, aumentar a biodisponibilidade oral, permitir a liberação do fármaco ao órgão ou tecido alvo e também favorecer a manutenção das concentrações plasmáticas (ABDELWAHED et al, 2006).

O potencial da aplicação da nanotecnologia no desenvolvimento de antimicrobianos nanoestruturados tem sido evidente (PINTO-ALPHANDARY; ANDREMONT; COUVREUR, 2000). Em 2006, Rukholm e colaboradores desenvolveram lipossomas de gentamicina. Pertencente à classe dos aminoglicosídeos, este fármaco representa uma importante opção terapêutica para pacientes alérgicos aos β -lactâmicos, apesar de apresentar uma grande toxicidade. Neste trabalho, os lipossomas de gentamicina exibiram uma menor toxicidade e uma maior potência frente a cepas de *Pseudomonas sp* quando comparados com o fármaco em sua forma livre. Já em um estudo realizado por Shailesh e Kulkarni (2014), foram desenvolvidos e avaliados lipossomas de mupirocina para uso em curativos de diabéticos. Este sistema

forneceu uma barreira que impediu de maneira eficaz a contaminação da ferida e a progressão da infecção para tecidos mais profundos.

Paz e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antibiofilme *in vitro* de fluconazol livre e lipossomas de fluconazol. O estudo concluiu que a concentração de lipossomas de fluconazol necessária para erradicação do biofilme foi menor que a concentração do fármaco livre. Em 2007, Wanderley realizou estudo comprovando que a encapsulação em nanocápsulas de copolímero D,L-(lático-glicólico) do ácido úsnico potencializou sua atividade antimicrobiana *in vitro*. Análise da atividade intracelular revelou um aumento de até 30% na sua atividade.

Em um estudo realizado por Flores e colaboradores (2011), nanocápsulas contendo o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foram preparadas, proporcionando uma maior proteção do óleo frente à volatilização. A avaliação da atividade antifúngica das formulações foi testada frente a leveduras de *Candida albicans* e *Trychophyton rubrum*, demonstrando uma inibição e controle do crescimento. Também neste estudo, houve o desenvolvimento de hidrogéis contendo os sistemas nanoestruturados. Os hidrogéis contendo o sistema coloidal com óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* demonstraram atividade, ao contrário do gel contendo apenas o óleo livre.

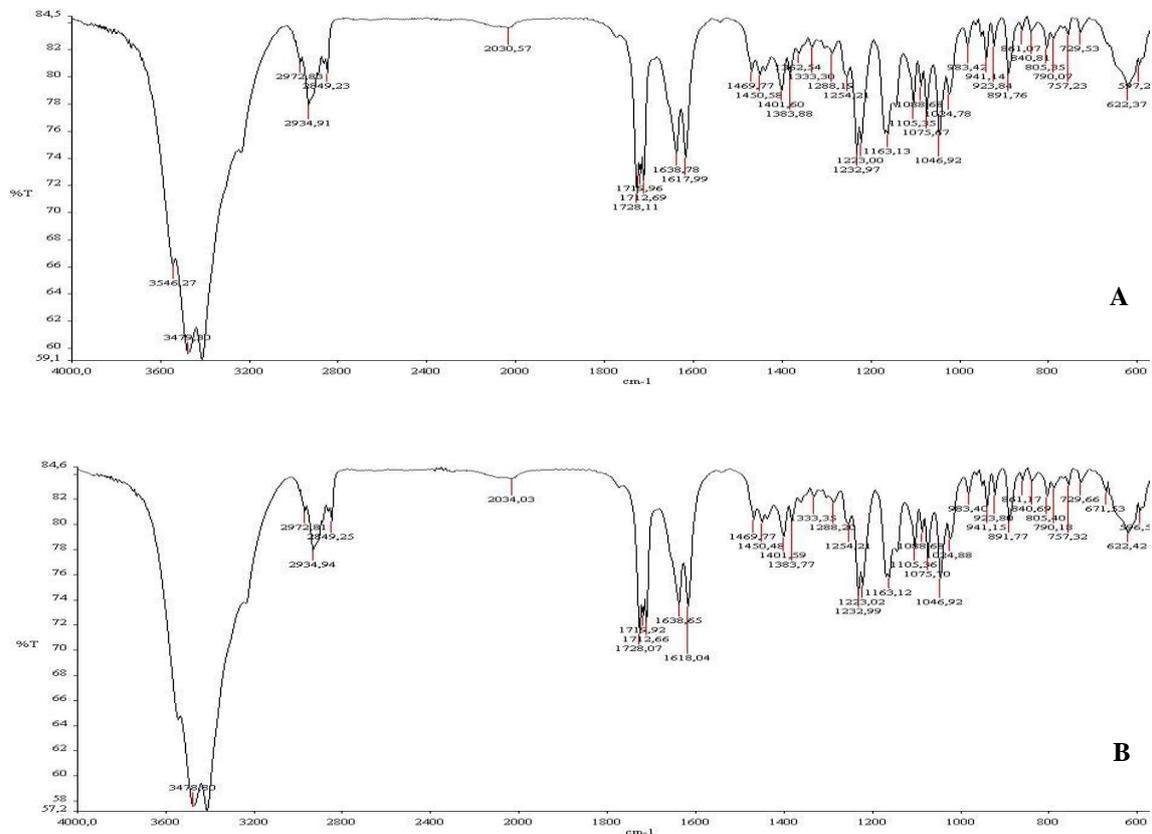
Através da nanotecnologia pode-se conseguir inúmeras vantagens principalmente no que diz respeito ao carregamento de fármacos e sistemas de liberação controlada. Por apresentarem um tamanho bastante reduzido, nanocápsulas podem facilitar a entrada do fármaco na matriz polimérica do biofilme e aumentar sua potência antimicrobiana.

4 CARACTERIZAÇÃO DA MUPIROCINA MATÉRIA-PRIMA

Para a caracterização da matéria-prima MUP foi utilizada a espectroscopia na região do infravermelho. Pesou-se 2 mg da matéria-prima, que foi misturada com 300 mg de brometo de potássio. Após a mistura dos pós, o material resultante foi prensado, com auxílio de prensa hidráulica, para confecção da pastilha. Esta pastilha foi analisada em um espectrometro de infravermelho com transformada de Fourier (Perkin Elmer®) para obtenção do espectro. O mesmo procedimento foi realizado para a mupirocina SQR da United States Pharmacopeia (USP). Os espectros obtidos foram avaliados quanto as principais bandas características dos grupos funcionais das moléculas e o índice de similaridade encontrado foi de 0,9998.

Na Figura 5 podemos observar os espectros, no intervalo de 4000 a 600 cm^{-1} e as principais bandas características da matéria-prima e SQR.

Figura 5 – Espectros na região do infravermelho obtidos a partir de: SQR de mupirocina (A) e mupirocina matéria-prima (B), preparados em pastilhas de KBr.

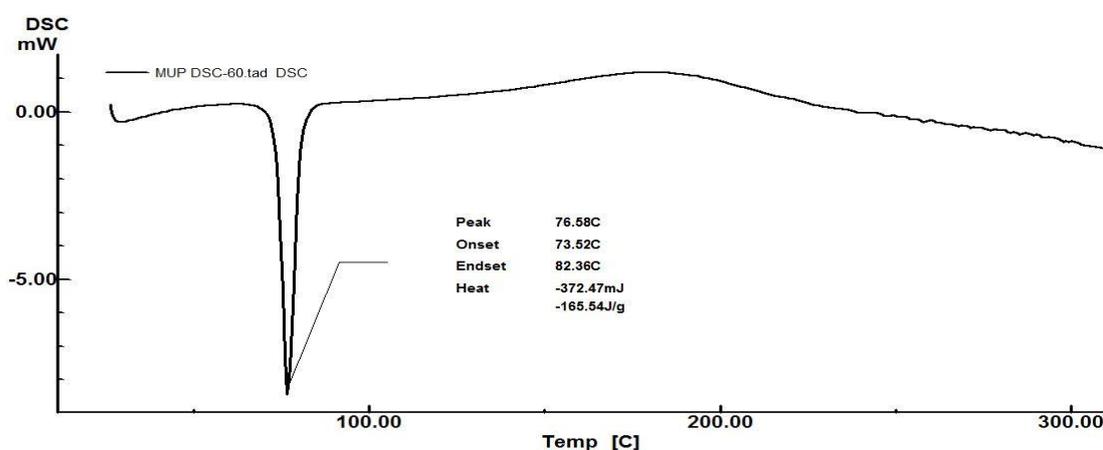


Cada substância apresenta um espectro na região do infravermelho e a elucidação da sua estrutura química se dá através da análise das frequências de determinados grupos funcionais (SILVERSTAIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007). A partir das principais frequências características dos grupos químicos da matéria-prima e SQR, podemos inferir que a matéria-prima utilizada neste estudo é mupirocina.

Posteriormente, foi realizada análise térmica da matéria-prima através da Calorimetria Exploratória Diferencial. O termograma foi obtido com o auxílio do equipamento DSC-60 cell (Shimadzu®), com sensibilidade de 0,1°C, utilizando um cadinho de alumínio e 2 mg de amostra. A temperatura utilizada para o ensaio foi de 30 a 300°C, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min, em atmosfera de nitrogênio com vazão de 100 mL/min.

Na Figura 6 podemos observar o termograma característico da mupirocina matéria-prima.

Figura 6 – Termograma da mupirocina matéria-prima.



A DSC é uma técnica utilizada pela indústria farmacêutica para avaliar propriedades físico-químicas de fármacos, excipientes e suas possíveis interações, estabilidade e cinética de degradação (VECCHIO; RODANTE; TOMASSETTI, 2001; YOSHIDA et al., 2011).

De acordo com a figura acima podemos observar um evento endotérmico em torno de 76,58 °C, evento este característico do processo de fusão dos cristais do fármaco, resultado semelhante encontrado por Thakur e colaboradores (2008).

ARTIGO 1

Artigo aceito no periódico *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 53, n.1, 2017.

Preparation of mupirocin-loaded polymeric nanocapsules using essential oil of rosemary.

PREPARATION OF MUPIROCIN-LOADED POLYMERIC NANOCAPSULES USING ESSENTIAL OIL OF ROSEMARY

Jaqueline Bandeira Rubenick^{1*}, Alexandre Machado Rubim^{1,2}, Francieli Bellé¹, Daniele Rubert Nogueira-Librelotto¹ and Clarice Madalena Bueno Rolim¹

¹Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, ²Laboratory Drug Quality Control, Franciscan University Center, Santa Maria, RS, Brazil

***Correspondence:**

J. B. Rubenick

Departamento de Farmácia Industrial

Universidade Federal de Santa Maria

Av. Roraima, 1000 - Prédio 26

97.105-900 - Santa Maria - RS, Brasil

E-mail: jaquerubenick2@gmail.com

The purpose of this study was to prepare and characterize mupirocin-loaded polymeric nanocapsules using two different oils and to develop and validate an analytical method for quantitative determination by high performance liquid chromatography. The mean size of the nanoparticles was 233.05 nm and 275.03 nm for nanocapsules with a rosemary oil like oily core and caprylic/capric triglyceride, respectively, and a good polydispersity index below 0.25 for both formulations. The nanocapsules showed good stability when stored at 40 °C and room temperature for 30 days. The quantitative method was performed with a mobile phase consisting of ammonium ammonium acetate (0.05 M adjusted to pH 5.0 with acetic acid) and acetonitrile 60:40 (v/v); the flow rate was 0.8 mL/min, UV detection at 230 nm. The analytical method was linear in the range of 5.0-15.0 µg/mL, specific for both oils, accurate, precise (intermediate precision RSD = 1.68% and repeatability RSD = 0.81%) and robust under the evaluated conditions. Therefore, this method can be performed for quantification of mupirocin in polymeric nanocapsules containing both oils.

Uniterms: High Performance Liquid Chromatography. Mupirocin. Polymeric nanocapsules. Rosemary oil.

INTRODUCTION

Mupirocin (MUP) is an antibiotic used to treat skin surface infections. It is highly effective against *Staphylococcus* and *Streptococcus*, and is utilized to control methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The chemical structure consists of a chain of fatty acids loaded on monic acid by an ester type linkage that mimics the carbon skeleton of isoleucine, competing with this aminoacid for the active site of isoleucyl-tRNA bacterial synthetase, inhibiting bacterial protein synthesis. However, reports of increased resistance to mupirocin are a matter of concern (Martindale, 2011; Poovelikunnel, Gethin, Humphreys, 2015; Sutherland, *et al.*, 1985; Thomas, *et al.*, 2010).

MUP is a crystalline white powder, slightly soluble in water, freely soluble in acetone and dichloromethane. It is a strong acid with a pKa value 4.83, presenting a molecular formula $C_{26}H_{44}O_9$, melting point about 77–78 °C and a partition coefficient of 2.25 (British Pharmacopoeia, 2012; Martindale, 2011; USP, 2012).

Recently, several studies have reported utilizing molecules with activity against microorganisms that are capable of forming biofilm in different places (Comin, *et al.*, 2016; Iannitelli, *et al.*, 2011; Jain, *et al.*, 2009; Maryam, *et al.*, 2015). Along these lines, MUP-loaded polymeric nanocapsules were developed by our research group in an attempt to increase the activity of MUP against *Staphylococcus aureus*.

Nanocapsules are vesicular systems in which the drug is confined to a cavity surrounded by a single polymer. These systems present a particle size less than 1 μm . They have the capacity to control the drug release profile, increase the stability of drugs during storage and provide vectoring through organs and cells (Couvreur, *et al.*, 2002; Schaffazick, Guterres, Freitas, 2003, Zili, Sfar, Fessi, 2005).

In order to ensure reliable and interpretable information about a sample, the analytical methods must first be validated. The validation of the analytical method is a continuous process that starts by planning an analytical and continuous strategy throughout the development period (Ribani, *et al.*, 2004).

Some analytical methods have been described in the literature for the determination of MUP in pharmaceutical formulations, liposomal hydrogels, and penetrations studies (Berg, 2011; Echevarría, *et al.*, 2003; Jagota, *et al.*, 1992; Shailesh, Kulkarni, 2014). Official techniques for quality control of MUP in raw material, cream, ointment and, nasal ointment are described in The United States Pharmacopeia and British Pharmacopeia (British Pharmacopoeia, 2012; USP, 2012).

Due to the lack of a methodology for the determination of MUP in polymeric nanocapsules, this study aimed to develop and validate a method for the determination of MUP in polymeric nanocapsules containing essential oil of rosemary and caprylic/capric triglyceride, as well as to study the stability and the physical-chemical properties of the different formulations).

MATERIAL AND METHODS

Reagents and materials

MUP with 100.0% purity standard substance was obtained from The United States Pharmacopeia, batch G0M003. The MUP raw material batch: 15537/2014 (purity 96.9%) was kindly supplied by Cristália[®]. The polymeric nanocapsule excipients were: poly(ϵ -caprolactone) (PCL, MW: 70000–90000) and sorbitan monostearate 60 (Span[®]60) which were purchased from Sigma-Aldrich[®] (São Paulo, Brazil), essential oil of rosemary was purchased from Petite Marie[®] (Itaquaquecetuba, Brazil), caprylic/capric triglyceride (Crodamol[®] GTCC) from Alpha Química[®] (Porto Alegre, Brazil), polysorbate 80 (Tween[®] 80) purchase from Synth[®] and acetone from Synth[®]. All other reagents and solvents used were of analytical grade.

Instrumentation and chromatography conditions

The apparatus used for the LC analysis was a Shimadzu[®] system (Kyoto, Japan), equipped with an LC-20AT pump, SIL-20A ht auto sampler, CTO-20AC column oven, SPD-M20A PDA detector, CBM-20A system controller, and LC solution software was used to quantify the samples. The Ultra Basic Denver potentiometer was used to determine the pH of all solutions. Chromatography separations were achieved using the modified method of the British Pharmacopeia 2012. The separations were performed with a Merck[®] C18 column (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m) at 25 °C. The mobile phase composition was ammonium acetate (0.05 M adjusted to pH 5.0 with acetic acid) and acetonitrile 60:40 (v/v). The flow rate was 0.8 mL/min, the UV detection was set at 230 nm and the injected volume was 10 μ L.

Development and characterization of polymeric nanocapsules containing mupirocin

Polymeric nanocapsules containing MUP were prepared by nanoprecipitation of pre-formed polymers (Fessi, 1989). The organic phase was constituted by PCL (100.0 mg), sorbitan monostearate 60 (76.6 mg), essential oil of rosemary (330.0 mg) and mupirocin (10.0 mg) dissolved in acetone (27.0 mL). This organic phase was added with moderate magnetic stirring into an aqueous phase constituted by the polysorbate 80 (76.6 mg) dissolved in water (55.0 mL). The aqueous phase quickly turned milky with bluish opalescence due to the formation of the nanoparticles. After nanoprecipitation, the acetone and a part of water were removed in a rotary evaporator and the nanoparticles were concentrated to a final volume of 10 mL (1.0 mg/mL of MUP). This formulation was called polymeric nanocapsules of mupirocin and rosemary (NCRM). The polymeric nanocapsules containing caprylic/capric triglyceride were prepared using the same procedure, but the core oil was formed by caprylic/capric triglyceride (330.0 mg). Thus, the given name of this formulation was polymeric nanocapsules of mupirocin and caprylic/capric triglyceride (NCMT).

The unloaded nanocapsules of rosemary oil and caprylic/capric triglyceride were called BNCR and BNCT, respectively. These formulations were prepared by the same method but without adding the drug.

Characterization of polymeric nanocapsules

Particle-size, zeta potential and pH: the zeta potential and particle-size distribution of the formulations were determined by Zetasizer Nano ZS[®] (Nanoseries, Malvern, UK). In both determinations, samples were diluted in Milli-Q water. The pH values were determined by an Ultra Basic Denver[®] potentiometer calibrated with pH 4.0 and 7.0 solutions. The nanoparticles were analyzed directly on the electrode. The reported results are the mean values obtained after analyzing three batches of each formulation.

Determination of drug content and encapsulation efficiency

For the analysis of drug from nanocapsules, a quantity equivalent to 1000 µg of drug was transferred to a 10 mL volumetric flask and dispersed in acetonitrile. To optimize the extraction method the volumetric flasks were kept under sonication for 15 min. Then a 1.0 mL aliquot was pipetted into a 10 mL volumetric flask and diluted with the same solvent. The samples were then filtered using a nylon membrane with 0.45 µm porosity. The analysis was performed using the previously developed HPLC method.

To determine the encapsulation efficiency 300 µL of each formulation were placed in Amicon Ultra[®] filters and centrifuged at 10000 rpm for 15 minutes. The encapsulation

efficiency was calculated by the difference between the total drug content and the drug content found in the ultrafiltrate.

Stability evaluation

The different nanoparticles were kept at room temperature and at 40 °C for 30 days. The effects of storage time (0, 15 and 30 days) on the pH, particle size, zeta potential, drug content and encapsulation efficiency were determined. The stability studies were performed in three different batches of each formulation.

Development and validation of the HPLC method

The method was validated according to the official guidelines (ANVISA, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2007). The parameters evaluated were: specificity, linearity, precision, accuracy, robustness, detection and quantification limits. The polymeric nanocapsules (NCMR) were used to develop this method.

Specificity

Method specificity was assessed using a standard solution containing MUP, samples of MUP-loaded polymeric nanocapsules (NCMR and NCMT) and nanoparticles without MUP (BNCR and BNCT). Moreover, the specificity was evaluated for stress testing (ICH, 2005). All the samples were analyzed in triplicate. The stress conditions follow:

Hydrolytic conditions: 10 mg of MUP reference substance were dissolved in a 10 mL volumetric flask with acetonitrile. Then, a 1 mL aliquot was transferred to a 10 mL volumetric flask and dissolved in HCl 0.1 M and NaOH 0.1 M. After 24 hours, the samples were neutralized and analyzed.

Photolytic degradation: 10 mg of MUP reference substance were dissolved in a 10 mL volumetric flask with acetonitrile. Next, a 1 mL aliquot was transferred to a 10 mL volumetric flask and dissolved with acetonitrile. This solution was exposed to UV light ($\lambda = 254$ nm) for 24 hours. Then, a 1 mL aliquot was transferred to a 10 mL volumetric flask and dissolved with acetonitrile.

Oxidative condition: 10.0 mg of MUP reference substance were dissolved in a 10 mL volumetric flask with acetonitrile. After that, a 1 mL aliquot was transferred to a 10 mL

volumetric flask and dissolved in hydrogen peroxide 3%. After, 24 hours, a 1 mL aliquot was transferred to a 10 mL volumetric flask and dissolved in acetonitrile.

Temperature condition: 10 mg of MUP reference substance were dissolved in a 10 mL volumetric flask with acetonitrile. Then, a 1 mL aliquot was transferred to a 10 mL volumetric flask and dissolved with acetonitrile. This solution was exposed at 40 °C. After 24 hours, a 1 mL aliquot was transferred to a 10 mL volumetric flask and dissolved in acetonitrile.

Linearity and detection and quantification limits

Linearity was determined by constructing three independent analytical curves ($n = 3$) with five linear concentrations of MUP (5.0, 8.0, 10.0, 12.0 and 15.0 $\mu\text{g/mL}$). All concentrations were diluted in acetonitrile and analyzed in triplicate on three consecutive days. The results were assessed by regression analysis using the least squares method to calculate the calibration curves. The detection and quantification limits were determined using an average standard curve, considering the intercept standard deviation and slope.

Precision

Precision was investigated with respect to repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day). Repeatability was assessed by assaying the concentrations of 5.0, 10.0 and 15.0 $\mu\text{g/mL}$, in triplicate during the same day, by the same analyst and using the same instrumentation. Intermediate precision was assessed by carrying out the same analysis on 3 different days, with different instrumentation and analyst. This parameter was expressed as % of relative standard deviation (RSD).

Accuracy (Recovery method)

Accuracy was evaluated at concentration levels of 80, 100 and 120% where a known amount of MUP standard solution was added to sample solution. The theoretical and the measured concentration were then compared. The experiments were repeated three times.

Robustness

Robustness was evaluated using the method proposed by Youden and Steiner (1975). Small variations were induced in the nominal values of the method. The four parameters and

the variations variations introduced are shown in Table I. Then, eight runs were performed to determine the influence of each parameter on the final results. According to Nogueira and collaborators (2011), this method will be robust if conditions 1 and 2 are met:

Condition 1: (for factor A and other factors) content of MUP – $5\% \leq A \leq$ content of MUP + 5%.

Condition 2: (for factor A and other factors) $A - a \leq 3\%$ involving the MUP content.

TABLE I - Parameters and variations to evaluate the robustness of the chromatography method

Parameter	Variations	
Mobile phase rate (mL/min)	A - 1.0	a - 0.6
Acetonitrile concentration in mobile phase (%)	B - 42	b – 38
Sonication time for extraction of drug (minutes)	C - 20	c – 10
Column supplier	D - Phenomenex	d – Sunfire

An aliquot of each sample was transferred into an individual 10 mL volumetric flask, diluted to volume with acetonitrile, and filtered through a nylon membrane with 0.45 μm porosity, obtaining the final MUP concentration of 10.0 $\mu\text{g/mL}$. The concentrations of MUP presented in samples were determined from the analytical curve.

System suitability

System suitability was evaluated by five replicate analyses of MUP reference substance at a concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$. The parameters assessed were: number of theoretical plates and tailing factor.

Statistical analysis

All tests were performed in 3 replicates and the results were expressed as average \pm standard deviation. The results were submitted to (ANOVA) followed by Tukey test at a significance level of 5%.

RESULTS AND DISCUSSION

Development and optimization of the method

The development of safe, reliable analytical methods is a very important tool for the quality control of pharmaceutical products and raw material. The chromatography technique is a good alternative for performing analysis of drug from nano-based formulations, since it is necessary to have a total separation of the drug from the formulation components (Harter, 2014).

Based on the official method (British Pharmacopoeia, 2012), some chromatography conditions were evaluated to optimize this method. Firstly, a mobile phase was tested containing a mixture of methanol and water (75:25 v/v), however, it was not stable at baseline. Another mixture tested was methanol and water pH 5.0 (60:40 v/v), but this condition affected the retention time and shape of the MUP peak. Similar results were shown by Amrutiya, Madan and Bajaj, (2010) when researching the simultaneous quantification of prednicarbate, MUP and ketoconazole in topical dosage form. In this work several eluent mixtures and pH values were evaluated to obtain a good separation.

System suitability

To obtain the best chromatographic method, the mobile phase was composed by ammonium acetate (0.05 M, adjusted to pH 5.0 with acetic acid) and acetonitrile 60:40 (v/v), with a flow rate of 0.8 mL/min. These conditions were utilized to provide an adequate peak and satisfactory results according to criteria evaluated. Five replicates of MUP reference substance were evaluated at a concentration of 10 µg/mL. After chromatogram analysis, the number of theoretical plates and tailing factor were determined. The average values obtained were 4628 and 1.19, respectively.

Specificity

The chromatograms (Figure 1) obtained during the specificity test showed that none of the formulation excipients were eluted in the same retention time as the MUP peak.

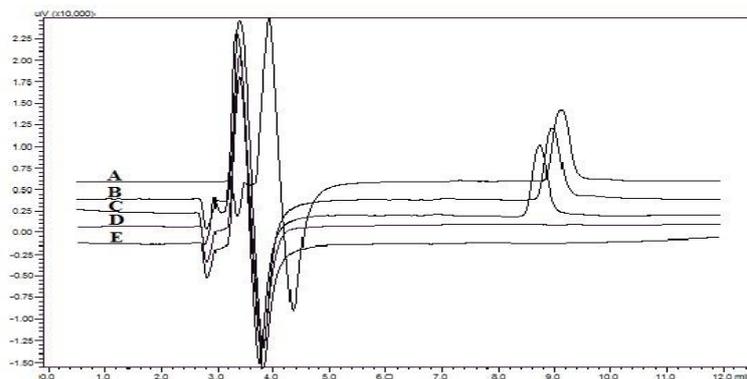


FIGURE 1 - Chromatograms corresponding to: (A) solution of MUP reference substance, (B) Nanocapsules of MUP and caprylic/capric triglyceride oil, (C) Nanocapsules of MUP and rosemary oil, (D) Unloaded nanocapsules of rosemary oil and (E) unloaded nanocapsules of caprylic/capric triglyceride oil.

Furthermore, the interference of potential degradation products was investigated through a forced degradation test. These studies were performed to identify the factors that would affect the drug stability. Usually the range of degradation is 10% to 30% (Chan, 2004).

After evaluation of stress conditions (temperature 40 °C and oxidative 3%), the concentration remained constant and no possible degradation product of the MUP reference substance was found. In acid and basic hydrolysis, as well as under photolytic conditions (Figure 2) the residual drug content after 24 hours was 10.23%, 6.76% and 16.93%, respectively in relation to the value obtained in the initial analysis.

In the chromatograms obtained after acid and basic hydrolysis, the formation of possible degradation products can be seen at about 3 min and 7 min, respectively.

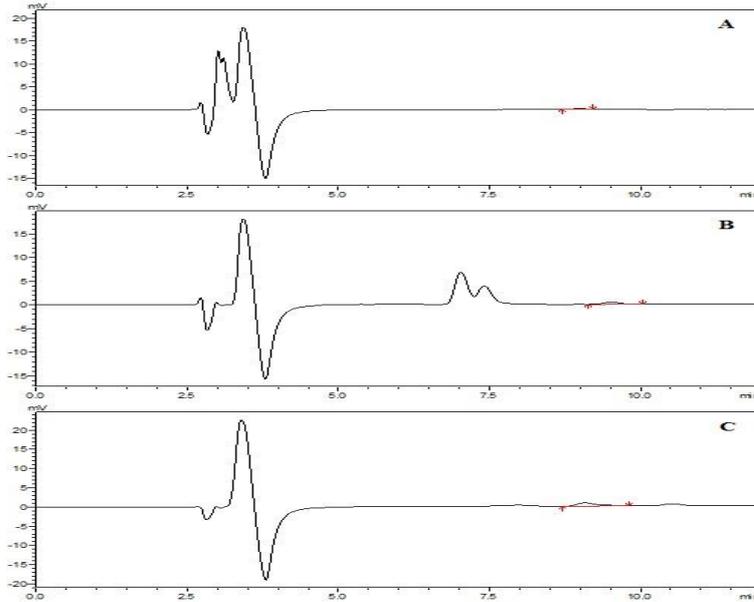


FIGURE 2 - Chromatograms corresponding to: (A) solution of MUP time 24 hours after acid hydrolysis, (B) solution of MUP time 24 hours after basic hydrolysis and (C) solution of MUP time 24 hours after photolytic conditions.

Linearity

According to Figure 3, the linearity was observed over the concentration range of 5.0 to 15.0 $\mu\text{g/mL}$, and the analytical curve equation obtained was $y = 18386x - 9906$ (where, x is concentration and y is the peak absolute area). The statistical analysis showed significant linear regression ($F_{\text{cal}} = 6171.664 > F_{\text{tab}} = 4.96$) and no significant deviation from linearity ($F_{\text{cal}} = 2.0031 < F_{\text{tab}} = 3.71$).

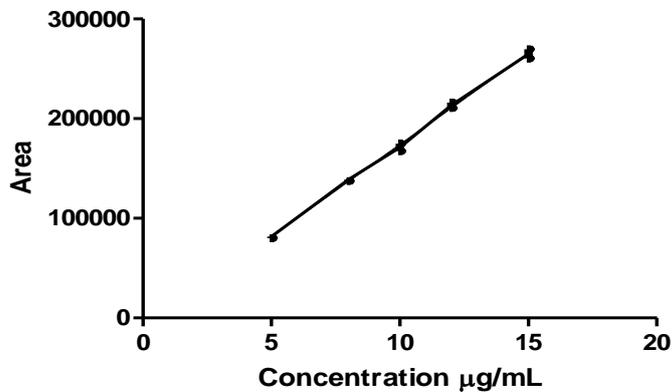


FIGURE 3 - Analytical curve of MUP.

The quantification and detection limits were 1.68 $\mu\text{g/mL}$ and 0.56 $\mu\text{g/mL}$, respectively demonstrating the sensibility of the method for low concentrations.

Precision

This parameter was evaluated as intermediate precision and repeatability and was expressed as relative standard deviation (RSD %). Accordingly, Tables II and III show the mean RSD values of 1.68% and 0.69%, respectively, indicating the method precision over the concentration range. The limit recommended for this evaluation is RSD less than 5% (ANVISA, 2003).

TABLE II - Values obtained for the intermediate precision determination for MUP-loaded polymeric nanocapsules with rosemary oil

Day	N	Analyst 1	Analyst 2	Average \pm SD	RSD (%)
	1	98.89	96.16		
1	2	99.98	99.68	98.69 \pm 1.371	1.39
	3	99.10	98.33		
	1	99.13	97.71		
2	2	103.20	100.06	99.92 \pm 1.858	1.86
	3	100.38	99.04		
	1	100.59	101.24		
3	2	100.80	102.48	100.59 \pm 1.791	1.78
	3	97.19	101.22		
Average content (%)				99.73	
Average RSD (%)					1.68

RSD – relative standard deviation. SD – standard deviation.

TABLE III - Values obtained for the repeatability determination for MUP-loaded polymeric nanocapsules with rosemary oil

Sample concentration µg/mL	Drug content (%)	Average ± SD	RSD (%)
5	98.38	98.49 ± 0.1629	0.17
	98.42		
	98.68		
10	97.98	97.92 ± 0.9063	0.93
	98.80		
	96.99		
15	98.56	98.94 ± 0.9640	0.97
	100.04		
	98.23		
Average content (%)		98.45 ± 0.5112	
Average RSD (%)			0.69

RSD – relative standard deviation. SD – standard deviation.

Accuracy (Recovery method)

Three concentration levels and three replicates of each concentration were used to determine accuracy. The average percentage obtained was 98.85%–101.39% satisfying the acceptance criteria between 98.0% and 102.0% for this study (Shabir, 2003).

Robustness

The method described by Youden and Steiner (1975), makes it possible not only to evaluate method robustness, but also to sort the variation of each parameter in the final results. According to Tables IV and V, the values showed satisfactory robustness of the method.

The variation of some method parameters did not change the MUP content in the sample significantly. The results meet conditions 1 and 2, and were therefore considered a robust method for the determination of MUP-loaded polymeric nanocapsules.

TABLE IV - Combinations tested to evaluate the robustness, evaluating condition 1

Combination assay								
Results	s	T	u	v	w	x	y	Z
Content ^a (%)	98.73	99.04	99.61	100.02	99.51	98.52	99.19	99.05
Average content (%)	99.21							
RSD (%)	0.49							
Acceptable range for content of mupirocin (%)				94.74% ≤ 99.73 ^b ≤ 104.72%				

^aaverage of three determinations. ^bvalue obtained of intermediate precision. RSD - relative standard deviation.

TABLE V - Combinations tested to evaluate the robustness, evaluating condition 2

Content of mupirocin (%)		Difference (%)	Limits for the difference (3%*99.73^a%)	
A = 99.35	a = 99.07	A – a = 0.28	2.99	
B = 98.95	b = 99.47	B – b = - 0.52	2.99	
C = 99.26	c = 99.16	C – c = 0.10	2.99	Robust
D = 99.00	d = 99.42	D – d = - 0.42	2.99	
E = 98.98	e = 99.44	E – e = - 0.46	2.99	
Average content (%): 99.21				
SD: 0.2031				
RSD (%): 0.2				

^a value of intermediate precision obtained. SD – standard deviation. RSD - relative standard deviation.

Preparation and characterization of polymeric nanocapsules

Blank formulations and MUP-loaded polymeric nanocapsules were prepared through a nanoprecipitation technique. Table VI summarizes some physical-chemical characteristics after preparation of formulations containing the different oils.

TABLE VI - Physical-chemical characteristics of nanocapsules of MUP and rosemary oil (NCMR), nanocapsules of MUP and caprylic/capric triglyceride oil (NCMT), unloaded nanocapsules of rosemary (BNCR) and unloaded nanocapsules of caprylic/capric triglyceride (BNCT)

Samples	Mean size ^b	ζ-Potential	pH ^b	Encapsulation	Drug
	± S.D.(nm)	^b (mV)		Efficiency ^b	content ^b
				(% w/w)	± S.D. (%)
NCMR	233.05	-33.44	4.5	97.46	100.50
	± 1.94 (0.25) ^a		± 0.78		± 0.15
BNCR	213.0	- 33.97	5.6	-----	-----
	± 2.66 (0.22) ^a		± 1.08		
NCMT	275.03	-32.21	4.4	84.61	99.20
	± 2.91 (0.22) ^a		± 0.84		± 0.10
BNCT	229.77	- 31.10	5.8	-----	-----
	± 1.72 (0.19) ^a		± 0.19		

^a polydispersity index. ^b values represent the average between the 3 batches.

Before preparing the nanocapsules, the drug solubility was determined between different oils. The solubilities of MUP in rosemary oil and caprylic/capric triglyceride were 263.8 mg/mL and 54.3 mg/mL respectively. All the formulations presented particle sizes lower than 300 nm with a good monomodal distribution profile. The particle sizes were 233.05 ± 1.94 nm and 275.03 ± 2.91 nm for the nanocapsules with rosemary oil and caprylic/capric triglyceride oil, respectively. The polydispersity index (PDI) found was 0.25 and 0.22 indicating a uniform system size for both formulations. Similar results have been reported for essential oil of rosemary when prepared by the nanoprecipitation method (Ephrem, 2014). A PDI value lower than 0.5 is appropriate for colloidal suspension, indicating that the distribution size of the nanocapsules is homogeneous (Kumar, 2015; Wu, Zhang, Watanabe, 2011).

The pH values for NCMR and NCMT were 4.5 and 4.4, however for BNCR and BNCT the pH values were 5.6 and 5.8. These values can be justified by the acidic nature of the drug and due to the utilization of PCL around the core oil. In general, the pH values of the polymeric nanocapsules can vary from 3.0 to 7.5 when prepared according to the nanoprecipitation method (Mora-Huertas, Fessi, Elaissari, 2010).

Mupirocin was quantified after 15 min of extraction using acetonitrile as solvent. The average drug content in different formulations was $100.05 \pm 0.15\%$ (NCMR) and $99.2 \pm 0.10\%$ (NCMT).

Stability evaluation

In order to evaluate the stability of MUP-loaded polymeric nanocapsules, the formulations containing the drug and unloaded nanocapsules were stored at room temperature and at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 days. The stability was evaluated by comparing the initial particle size, zeta potential, pH, encapsulation efficiency and drug content with those obtained after 30 days (Table VII).

TABLE VII - Physical-chemical characteristics after stability test of polymeric nanocapsules at room temperature and $40\text{ }^{\circ}\text{C}$

Samples	Mean size ^b ± SD (nm)		ζ-Potential ^b (mV)		pH ^b		Encapsulation efficiency ^b (% w/w)		Drug content ^b ± SD (%)	
	25 °C	40 °C	25 °C	40 °C	25 °C	40 °C	25 °C	40 °C	25 °C	40 °C
15 days										
NCMR	238.56	238.05	-33.7	-24.1	4.4	4.1	97.10	95.53	99.51	97.92
	± 0.21	± 1.08	± 1.85	± 1.02	± 0.12	± 0.11			± 0.24	± 0.14
BNCR	221.02	210.89	-30.2	-20.7	5.4	4.4	-----	-----	-----	-----
	± 0.14	± 1.58	± 1.08	± 1.77	± 0.06	± 0.14				
NCMT	268.8	279.93	-30.4	-28.2	4.5	3.8	83.19	82.48	98.90	97.50
	± 0.84	± 1.26	± 0.88	± 1.08	± 0.14	± 0.09			± 0.21	± 0.37
BNCT	224.53	234.21	-32.8	-28.5	5.7	4.5	-----	-----	-----	-----
	± 0.15	± 0.19	± 1.21	± 1.78	± 0.17	± 0.11				
30 days										
NCMR	235.42	241.03	-31.53	-25.20	4.48	3.67	98.83	96.02	98.18	98.44
	± 0.64	± 1.29	± 0.78	± 1.02	± 0.07	± 0.18			± 1.87	± 0.82
BNCR	218.89	238.18	-29.57	-22.58	5.42	4.01	-----	-----	-----	-----
	± 0.71	± 1.04	± 1.94	± 0.88	± 0.07	± 0.05				
NCMT	273.57	281.03	-31.95	-27.48	4.38	3.46	84.11	85.43	99.29	97.05
	± 1.57	± 1.35	± 1.33	± 0.91	± 0.08	± 0.11			± 1.66	± 1.3

BNCT	232.85	236.85	-30.01	-29.73	5.67	4.31	-----	-----	-----	-----
	± 0.85	± 0.38	± 0.11	± 1.78	± 0.04	± 0.09				

All samples showed a polydispersity index lower than 0.25. ^b Values represent the average between the 3 batches. Nanocapsules of mupirocin and rosemary oil (NCMR). Nanocapsules of mupirocin and caprylic/capric triglyceride oil (NCMT). Unloaded nanocapsules of rosemary oil (BNCR). Unloaded nanocapsules of caprylic/capric triglyceride oil (BNCT).

After 30 days of storage at room temperature and 40 °C, considering the average particle size, all formulation exhibited a similar characteristic when compared to the formulation at the initial time ($p > 0.05$). After 30 days of storage at 40 °C, the pH values were significantly reduced in all formulations compared to the formulation at the initial time ($p < 0.05$). This can be explained by the higher temperature, promoting increased polyester rates of hydrolysis and a reduction of the pH values and acidic characteristic of the drug (Mallin 1996).

The MUP-loaded polymeric nanocapsules and unloaded nanocapsules exhibited a similar zeta potential under both conditions (room temperature and 40 °C). All values were negative, which confirms the stability of nanocapsules. A zeta potential value around ± 30 mV is assumed to be good for formulations (Kumar, 2015). The negative potential values of the samples are related to the presence of polysorbate 80, presenting a negative surface density of charge (Marchiori *et al.*, 2010).

CONCLUSIONS

The rosemary and caprylic/capric triglyceride oils were used as oily core for the formulations. The nanoparticles showed adequate particle size, monomodal size distributions and low polydispersity index. All samples showed a reduction of pH value after storage at 40 °C. On the other hand, the formulations showed adequate zeta potential according to the literature and appropriate quantity of mupirocin. The proposed analytical method was linear, selective for both oils, precise, accurate and robust for the determination of MUP-loaded polymeric nanocapsules, showing that it is a useful method for quality control of the proposed delivery system. The results of the present study showed promising data for the development of a new formulation containing MUP and rosemary oil in an attempt to increase the activity of MUP against *Staphylococcus aureus*.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by Projects 447548/2014-0 and 401069/2014-1 of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Brazil). J. B. Rubenick thanks CAPES (Brazil) for the Master's fellowship.

REFERENCES

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Brasília: Visalegis, 2003. p.15.

AMRUTIYA, N.; MADAN, M.; BAJAJ, A. Development and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Prednicarbate, Mupirocin and Ketoconazole in Topical Dosage Forms. *J. Anal. Chem.*, v.65, p.1148-1154, 2010.

BERG, O. A. Advanced delivery system for skin and burns therapy: mupirocin as an antibacterial model drug. University of Norway, 2011.

BRITISH PHARMACOPOEIA, London: The Stationery Office, v.2, p.1501-1503, 2012.

CHAN, C. C.; LEE, Y. C.; LAM, H.; ZHANG, X. Analytical method validation and instrument performance verification. *John Wiley & Sons*, New Jersey, 2004.

COMIN, V. M.; LOPES, L. Q. S.; QUATRIN, P. M.; DE SOUZA, M. E.; BONEZ, P.C.; PINTOS, F. G.; RAFFIN, R. P.; VAUCHER, R. DA.; MARTINEZ, D. S. T.; SANTOS, R. C. V. Influence of *Melaleuca alternifolia* oil nanoparticles on aspects of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Microb. Pathog.*, v.93, p.120-125, 2016.

COUVREUR, P.; BARRETT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule Technology: A review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.*, v.19, p.99 – 134, 2002.

ECHEVARRÍA, L.; BLANCO-PRÍETO, M.J.; CAMPANERO, M.A.; SANTOYO, S.; YGARTUA, P. Development and validation of a liquid chromatographic method for in vitro mupirocin quantification in both skin layers and percutaneous penetration studies. *J. Chromatogr. B.*, v.796, n.2, p.233-241, 2003.

EPHREM, E.; GREIGE-GERGES, H.; FESSI, H.; CHARCOSSET, C. Optimisation of rosemary oil encapsulation in polycaprolactone and scale-up of the process. *J. Microencapsul.*, v.31, p.746-753, 2014.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Jejunal absorption, pharmacological activity, and pharmacokinetic evaluation of indomethacin-loaded poly(D,L-lactide) and poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules in rats. *Int. J. Pharm.*, n.55, p.R1-4, 1989.

HARTER, A. P. G.; MOTTA, M. H.; BARROS, J. G.; RIBEIRO, R. F.; ADAMS, A. I. H.; SCHAFFAZICK, S. R.; DA SILVA, C. B. Desenvolvimento de um método para a determinação de tioconazol associado a nanocápsulas poliméricas por cromatografia líquida. *Quim. Nova.*, v.37, p.996-999, 2014.

IANNITELLI, A.; GRANDE, R.; STEFANO, A.; GIULIO, M.; SOZIO, P.; BESSA, L. J.; S. LASERRA, S.; PAOLINI, C.; PROTASI, F.; CELLINI, L. Potential Antibacterial Activity of Carvacrol-Loaded poly (DL-Lactide-co-Glycolide) (PLGA) Nanoparticles against Microbial Biofilm. *Int. J. Mol. Sci.*, v.12, p.5039-5051, 2011.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, *Normalização e qualidade industrial*. DOQ-CGCRE-008, 2007. Available at: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf. Accessed on: 26th Feb. 2016.

ICH. International Conference on Harmonisation. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, Q2 (R1), 2005.

JAGOTA, N. K.; STEWART, J. T.; WARREN, F. W.; JOHN, P. M. Stability of mupirocin ointment (Bactroban) admixed with other proprietary dermatological products. *J. Clin. Pharm. Ther.*, v.17, p.181-184, 1992.

JAIN, P.; JAIN, S.; PRASAD, K. N.; JAIN, S. K.; VYAS, S. P. Polyelectrolyte coated multilayered liposomes (nanocapsules) for the treatment of Helicobacter pylori infection. *Mol. Pharm.*, v.6, p.593–603, 2009.

KUMAR, S.; CHUAHAN, N.; KUMAR, M. G. R.; DILBAGHI, N. Development and evaluation of alginate-chitosan nanocapsules for controlled release of acetamiprid. *Int. J. Biol. Macromolec.*, n.81, p.631-637, 2015.

MALLIN, M.; VAINIO, H.; KARJALAINEM, K.; SEPPALA, J. Biodegradable lactone copolymers. II. Hydrolytics study of ϵ -caprolactone and lactide copolymers. *J. Appl. Polym. Sci.*, n.59, p.1289-1298, 1996.

MARCHIORI, M. L.; LUBINI, G.; DALLA NORA, G.; FRIEDRICH, R. B.; FONTANA, M. C.; OURIQUE, A. F.; BASTOS, M. O.; RIGO, L. A.; SILVA, C. B.; TEDESCO, S. B.; BECK, R. C. R. Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization, and in vitro drug release study. *Drug. Develop. Ind. Pharm.*, n.8, p.962-971, 2010.

MARTINDALE, *The complete drug reference*, Pharmaceutical Press, London, 2011.

MARYAM, I.; HUZAIFA, U.; HINDATU, H.; ZUBAIDA, S. Nanoencapsulation of essential oils with enhanced antimicrobial activity: A new way of combating antimicrobial Resistance. *J. Pharm. Phytochem.*, n.4, p.165-170, 2015.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.*, v.385, p.113-142, 2010.

NOGUEIRA, R.; WOLLINGER, W.; SILVA, T. E.; OLIVEIRA, L. M.; MOREIRA, G. F.; BARIN, J. S.; LAPORTA, L. V.; MESKO, M. F.; BITTENCOURT, C. F.; RODRIGUES, J. M.; CUNHA, V. S. Validation of a liquid chromatographic method for determination of related substances in a candidate certified reference material of captopril. *Braz. J. Pharm. Sci.*, v.47, p.351-362, 2011.

POOVELIKUNNEL, T.; GETHIN, G.; HUMPHREYS, H. Mupirocin resistance: clinical implications and potential alternatives for the eradication of MRSA. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.70, p.2681–2692, 2015.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.; COLLINS, C.; JARDIM, I. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova.*, n.27, p.771-780, 2004.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova.*, v.26, p.726-737, 2003.

SHABIR, G. A. Validation of HPLC methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the U.S. Food and Drug Administration, the U.S. Pharmacopoeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr. A*, v.987, p.57-66, 2003.

SHAILESH, T.; KULKARNI, P. K. Development and evaluation of mupirocin loaded liposomal hydrogels for Diabetic wound healing properties. *Ind. J. Adv. Chem. Sci.*, v.2, p.42-45, 2014.

SUTHERLAND, R.; BOON, R. J.; GRIFFIN, K.E.; MASTERS, P. J.; SLOCOMBE, B.; WHITE, A. R. Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, v.27, n.4, p.495–498, 1985.

USP, United States Pharmacopoeia Convention, Twinbrook Parkway, Rockville, v.35, n.3, p.3962-3963, 2012.

THOMAS, C. M.; HOTHERSALL, J.; WILLIS, C. L.; SIMPSON, T. J. Resistance to and synthesis of the antibiotic mupirocin. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.8, p.281-289, 2010.

YOU DEN, W.; STEINER, E. *Statistical manual of AOAC*. Washington: AOAC, 1975. 88 p.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, v.63, p.456-469, 2011.

ZILI, Z.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *Int. J. Pharm.*, n.294, p.261-267, 2005.

ARTIGO 2

Atividade antibiofilme de nanocápsulas poliméricas contendo mupirocina e óleo essencial de alecrim.

ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO MUPIROCINA E ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM.

RUBENICK, J.B.^{1,4}; RUBIM, A.M.^{1,4}; LOPES, L.Q.S.²; KLEIN, B.^{3,6}; NOGUEIRA-LIBRELOTTO, D.R.^{1,4}; CHRIST, R.C.V.^{2,5}; WAGNER, R.^{3,6}; ROLIM, C.B.^{1,4}

¹Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFSM; ²Laboratório de Microbiologia, Programa de Pós-Graduação em Nanociências, Centro Universitário Franciscano; ³Programa de Pós-graduação de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, UFSM; ⁴Departamento de Farmácia Industrial, UFSM; ⁵Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM; ⁶Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, UFSM.

RESUMO

O uso indiscriminado de antimicrobianos tem levado a uma crescente resistência de micro-organismos aos tratamentos terapêuticos convencionais e a não resposta ao tratamento convencional resulta no prolongamento da doença e, conseqüentemente, aumenta o risco de morte do paciente. Estudos apontam que, aproximadamente, 80% de todas as infecções microbianas em humanos estão relacionadas a biofilmes. Pretendeu-se através desse estudo, desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana de nanocápsulas poliméricas contendo óleo essencial de alecrim (NCOEA) e óleo essencial de alecrim associado ao antibiótico mupirocina (NCMUPOEA). Todas as formulações apresentaram tamanho de partícula inferiores a 300 nm e um bom perfil de distribuição monomodal. Os tamanhos de partícula e valores de pH encontrados foram $291,43 \pm 1,25$ nm e $286,03 \pm 1,23$ nm, 4,5 e 5,6 para as NCMUPOEA e NCOEA, respectivamente. A faixa de índice de polidispersão (PDI) encontrada para as formulações foi de 0,22 a 0,26, indicando um tamanho de sistema uniforme. O OEA usado na produção das nanocápsulas poliméricas, apresentou cânfora, 1,8-cineol e α -pineno como compostos majoritários. Na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi observado que a nanoencapsulação do óleo essencial de alecrim (OEA) apresentou um resultado melhor quando comparado com o OEA na forma livre. No ensaio que determina a concentração mínima de erradicação do biofilme, as concentrações que apresentaram redução no biofilme foram superiores em comparação aos resultados apresentados no CIM. Além disso, os resultados encontrados nos ensaios de citotoxicidade, através da viabilidade celular em células de fibroblastos e queratinócitos, demonstram-se satisfatórios, indicando a potencial aplicação clínica dessas formulações.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Microbiologia. Mupirocina. *Rosmarinus officinalis*.

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), infecções causadas por micro-organismos resistentes são hoje consideradas um dos principais problemas de saúde pública. A não resposta ao tratamento convencional resulta no prolongamento da doença e consequentemente aumenta o risco de morte do paciente. Organismos multirresistentes são encontrados principalmente em ambientes hospitalares e essa infecção por patógenos nosocomiais resistentes vem sendo relatada como uma das grandes causas de internações prolongadas e aumento dos custos com pacientes nesses ambientes (OKEKE et al., 2005; RODRIGUES; BERTOLDI, 2010; VALAPERTA et al., 2010).

A mupirocina é um antibiótico utilizado no tratamento de infecções superficiais de pele, possui alta atividade contra *Staphylococcus* e *Streptococcus*, além de ser utilizado para controlar a propagação de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (NAKAMA; NUREKI; YOKOYAMA, 2001; RODVOLD; MCCONEGHY, 2014). Este fármaco vem sendo amplamente empregado com o objetivo de eliminar carreadores nasais de *S. aureus* em ambientes hospitalares, controlando assim a sua disseminação e diminuindo o risco de infecções estafilocócicas nestes ambientes. No entanto, relatos de um aumento na resistência à mupirocina causam preocupação (COATES; BAX; COATES, 2009; ELTRINGHAM, 1997; SIMOR; DANEMAN, 2009).

Estima-se que 65% das infecções nosocomiais e 80% de todas as infecções microbianas sejam causadas por biofilmes (ROMLING; BALSALOBRE, 2012). Biofilmes são comunidades microbianas estruturadas e complexas, onde os micro-organismos estão aderidos em uma superfície biótica ou abiótica, constituindo um modo de crescimento protegido que lhes garante inúmeras vantagens em relação aos que se encontram de modo livre, destacando a maior resistência aos antimicrobianos (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; DUNNE, 2002; XU; MCFETERS; STEWART, 2000).

Este aumento na resistência clínica aos antimicrobianos, faz com que pesquisadores direcionem seus estudos a colônias de bactérias aderidas a superfícies produzindo biofilme, e a produtos naturais, óleos essenciais e metabólitos secundários extraídos de plantas, como alternativas a serem utilizadas como agentes antimicrobianos (CAVALCANTE et al., 2011; DONLAN, 2002; HOLANDA et al., 2005; MISHRA; TIWARI, 2011; RADULOVIC et al., 2013; SAVOIA, 2012).

O uso da nanotecnologia surge para superar esses desafios através de um sistema que permite estabilizar e melhorar o efeito de moléculas com potencial ação antimicrobiana, através

de uma liberação controlada e do direcionamento dessas substâncias a sítios específicos, levando muitas vezes a um aumento na eficácia do tratamento e a uma considerável redução dos efeitos adversos (FAROKHZAD; LANGER, 2006; HOLBAN; GESTAL; GRUMEZESCU, 2016; SCHAFFAZICK et al., 2003).

Neste contexto, este estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar nanocápsulas poliméricas contendo óleo essencial de alecrim e nanocápsulas de mupirocina e óleo essencial associados, a fim de avaliar a atividade antimicrobiana e o potencial de aplicação clínica dessas formulações.

MATERIAIS E MÉTODOS

REAGENTES E MATÉRIAS-PRIMAS

Mupirocina (MUP) substância química de referência da United States Pharmacopeia (USP), grau de pureza de 100,0%, lote G0M003. MUP matéria-prima, lote: 15537/2014 (pureza 96,9%) foi gentilmente fornecido pela Cristália[®]. Os excipientes utilizados na produção das nanocápsulas poliméricas foram: poli (ϵ -caprolactona) (PCL, PM: 70.000-90.000) e monostearato de sorbitano 60 (Span[®]60) que foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (São Paulo, Brasil), óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) adquirido de Petite Marie[®] (Itaquaquecetuba, Brasil), apresentando densidade de 0,925 g/cm³, triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico (Crodamol[®] GTCC) da Alpha Química[®] (Porto Alegre, Brasil), polissorbato 80 (Tween[®] 80) e acetona da Synth[®]. Todos os outros reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico.

INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Para a determinação do teor de fármaco e eficiência de encapsulação utilizou-se cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), através de um sistema Shimadzu[®] (Quioto, Japão), equipado com uma bomba LC-20AT, amostrador automático SIL-20A ht, forno de coluna CTO-20AC, detector PDA SPD-M20A, controlador de sistema CBM-20A. O potenciômetro Ultra Basic Denver foi utilizado para determinar o pH de todas as soluções. As separações cromatográficas foram realizadas utilizando o método modificado da British Pharmacopeia 2012. Utilizou-se uma coluna Merck[®] C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) a 25°C. A composição da fase móvel foi acetato de amônio (0,05 M ajustado a pH 5,0 com ácido acético)

e acetonitrila 60:40 (v/v). A vazão foi de 0,8 mL/min, a detecção UV foi ajustada à 230 nm e o volume injetado foi de 10 µL.

A caracterização do óleo essencial de alecrim (OEA) e a quantificação dos componentes majoritários do óleo extraído das nanocápsulas foram realizadas em um cromatógrafo a gás Varian Star 3400CX (CA, EUA) equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID), utilizando o método da Farmacopéia Brasileira com algumas adaptações. Uma alíquota de 1 µL das soluções foi injetada com auxílio de um amostrador automático Varian, modelo 8200 (CA, USA) na porta de injeção do cromatógrafo a uma temperatura de 230 °C no modo *split* de razão 1:20. Os compostos foram separados numa coluna capilar apolar de sílica fundida BPX 5 (25 m × 0.22 mm × 0.25 µm) (SGE, Austrália). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a uma pressão constante de 20 psi. A temperatura inicial da coluna foi ajustada para 40°C e mantida durante 1 min. Em seguida, um gradiente de temperatura foi iniciado subindo a 1°C/min até 60°C, 2 °C/min até 70°C, depois até 220°C por um aumento a 5°C/min e mantida em condições isotérmicas durante 3 min. A temperatura do detector foi mantida a 240°C. Uma série de n-alcenos homólogos foram analisados sob as mesmas condições cromatográficas para calcular o índice de retenção linear (IRL).

A análise qualitativa dos compostos foi efetuada por um cromatógrafo gasoso Shimadzu QP2010 Plus acoplado a espectrômetro de massas (GC/MS, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). Para estas análises, foram usadas as mesmas condições cromatográficas acima descritas e hélio foi utilizado como o gás de arraste. O detector foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons com uma energia de ionização de 70 eV e um intervalo de varredura de massas 35-350 m/z. Os analitos foram identificados com base na comparação com os espectros de massas disponível na biblioteca National Institute of Standards and Technology (NIST) e por comparação dos índices de retenção linear calculados com aqueles disponíveis na literatura científica. A quantidade percentual relativa de cada composto identificado foi determinada a partir da área do pico obtida a partir do detector FID.

DESENVOLVIMENTO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

Antes do desenvolvimento das nanocápsulas poliméricas, a solubilidade do fármaco no óleo teve que ser estudada. Resumidamente, uma quantidade em excesso de MUP foi transferida para erlenmeyers contendo 2 mL do óleo essencial de alecrim. Os frascos foram cobertos e agitados a 120 rpm em uma incubadora orbital (Novatecnica[®], NT712) durante 24 horas a 37 °C ± 0,5 °C. Após o equilíbrio, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm durante

10 minutos e depois a concentração de MUP solúvel no óleo foi determinada pelo método de CLAE, proposto por Rubenick e colaboradores (2017).

O ensaio de inchamento de polímero também foi realizado antes do desenvolvimento das nanocápsulas. Filmes de poli (ϵ -caprolactona) foram preparados utilizando clorofórmio como solvente para sua total solubilidade. Foram pesados em torno de 120 mg do polímero e dissolvidos em 10 mL de clorofórmio. Esta solução foi transferida para placas de petri que ficaram durante 24 horas em temperatura ambiente para a total evaporação do solvente. Os filmes formados foram pesados nos tempos zero, antes da imersão nos óleos, e em 3, 6, 9, 12, 15, 30 e 60 dias. Para cada pesagem, os filmes foram retirados do contato com o OEA e TACC e secos suavemente em papel absorvente.

As nanocápsulas foram preparadas através do método de nanoprecipitação de polímero pré-formado (Fessi, 1989). A fase orgânica foi constituída por PCL (100,0 mg), monoestearato de sorbitano 60 (115,0 mg), OEA (1500,0 mg) e MUP (50,0 mg) dissolvido em acetona (30,0 mL). Esta fase orgânica foi adicionada com agitação magnética moderada numa fase aquosa constituída por polissorbato 80 (115,0 mg) dissolvido em água (55,0 mL). A fase aquosa rapidamente tornou-se leitosa com opalescência azulada devido à formação das nanopartículas. Após a nanoprecipitação, a acetona e uma parte de água foram removidas num evaporador rotatório, com vácuo de -500 mmHg e banho de 30°C, e as nanopartículas foram concentradas até um volume final de 50 mL (1,0 mg/mL de MUP). Esta formulação foi denominada nanocápsula polimérica de mupirocina e óleo essencial de alecrim (NCMUPOEA). Nanocápsulas poliméricas contendo apenas OEA como núcleo oleoso foram preparadas utilizando o mesmo procedimento, mas neste caso a mupirocina não foi adicionada na fase orgânica. Assim, o nome dado a esta formulação foi nanocápsula polimérica de óleo essencial de alecrim (NCOEA). Para ambas formulações NCMUPOEA e NCOEA a concentração de óleo de alecrim é de 3,22%.

Posteriormente, através do mesmo método, foram preparadas nanocápsulas poliméricas contendo triglicérides do ácido cáprico/caprílico (1500,0 mg) como núcleo oleoso e sem adição de mupirocina na fase orgânica. A esta, damos o nome de nanocápsula polimérica branca (NCB).

CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

Tamanho de partícula, potencial zeta e pH

O potencial zeta e a distribuição de tamanho de partícula das formulações foram determinados por Zetasizer Nano ZS[®] (Nanoseries, Malvern, UK). Em ambas as determinações, as amostras foram diluídas em água Milli-Q. Os valores de pH foram determinados por um potenciômetro Ultra Basic Denver[®] calibrado com soluções de pH 4,0 e 7,0. As nanopartículas foram analisadas diretamente no eletrodo. Os resultados relatados são os valores médios obtidos após a análise de três lotes de cada formulação.

Determinação do teor de fármaco e eficiência de encapsulação

Para a análise do teor de fármaco nas nanocápsulas, uma quantidade equivalente a 1000 µg de fármaco foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e dispersa em acetonitrila. Para otimizar o método de extração, os frascos volumétricos foram mantidos sob sonicação durante 15 min. Em seguida, uma alíquota de 1,0 mL foi pipetada para um balão volumétrico de 10 mL e diluída com o mesmo solvente. As amostras foram então filtradas utilizando uma membrana de nylon com uma porosidade de 0,45 µm. A análise foi realizada utilizando método por CLAE, proposto por Rubenick e colaboradores (2017).

Para determinar a eficiência de encapsulação, 300 µL de cada formulação foram colocados em filtros Amicon Ultra[®] e centrifugados a 10.000 rpm durante 15 minutos. A eficiência de encapsulação foi calculada pela diferença entre o teor total de fármaco e o teor de fármaco encontrado no ultrafiltrado.

DETERMINAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM NAS NANOCÁPSULAS

Para as análises por cromatografia gasosa, o óleo essencial de alecrim foi primeiramente extraído das nanocápsulas. Para isso, 775 µL da suspensão, equivalente a 25 µL de OEA, foi condicionada em eppendorfs. Em seguida, 975 µL de hexano foram adicionados e a solução submetida a agitação em vórtex por 2 min. Posteriormente a solução foi centrifugada durante 15 min a 15.000 rpm. O óleo comercial puro utilizado para a fabricação das nanocápsulas também foi analisado. Para isso, 25 µL deste foram diluídos em 975 µL de hexano e submetido as análises cromatográficas nas mesmas condições. As soluções preparadas foram condicionadas em *vials* de injeção onde uma alíquota de 1 µL foi injetada no sistema cromatográfico.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Produção do inóculo

As estirpes de *Staphylococcus aureus* (ATCC 00039, ATCC 29213 e isolado clínico) pertencente à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Franciscano, foram semeadas em ágar Nutriente e incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C. Após o tempo de incubação, parte das colônias foram suspensas em solução fisiológica estéril e a turvação ajustada em espectrofotômetro para 0,5 na escala McFarland ($DO_{600} = 0,08$ a $0,1$).

Determinação da concentração inibitória mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada através da técnica de microdiluição em placas de 96 poços contendo 100 µL do caldo Mueller Hinton, seguindo o *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007)*. Realizou-se diluição seriada do óleo e do fármaco livre, assim como das formulações desenvolvidas, para verificar a menor concentração capaz de inibir o crescimento das estirpes testadas. O ensaio foi executado em triplicata e utilizou-se somente o inóculo dos microrganismos com o meio para o controle positivo. Após o procedimento, as placas foram levadas para a estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C. Passado o tempo de incubação, o ensaio foi revelado com uma substância que indica o crescimento bacteriano (2,3,5 cloreto de trifeniltetrazólio).

Determinação da concentração mínima de erradicação do biofilme

O ensaio para a determinação da concentração mínima de erradicação do biofilme (CMEB) foi realizado de acordo com o ensaio de CIM. Em placa de 96 poços, contendo 100 µL de caldo Mueller Hinton, adicionou-se 10 µL da suspensão contendo o microrganismo. A placa então foi incubada por 24 h em estufa bacteriológica, para a formação do biofilme. Após o tempo de incubação, os poços foram lavados três vezes com tampão fosfato (PBS) e colocados novamente em estufa durante 60 minutos para secagem das placas e posterior tratamento. Diluições seriadas do óleo e do fármaco livre, assim como das formulações desenvolvidas, foram realizadas para o tratamento do biofilme. Poços tratados com salina foram utilizados como controle negativo, e poços sem a formação do biofilme como controle de contaminação. Após o tratamento, a placa foi incubada novamente a 37 °C por 24 horas.

Em seguida, os poços foram lavados três vezes com PBS, e foram deixados em estufa de secagem por 60 minutos. Após, 150 µL de cristal violeta 0,1% (v/v) foi adicionado nos poços e deixado em temperatura ambiente por 15 minutos. Logo depois, os poços foram lavados novamente com PBS para a retirada do cristal violeta não aderido e então, 150 µL de etanol 95% foi adicionado em todos os poços para dissolver o cristal violeta aderido. Após 10 minutos, 100 µL de cada poço foi transferido para uma nova placa para a realização da leitura da absorbância em leitor de ELISA em 570 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando células de fibroblastos murinos (3T3) e queratinócitos humanos (HaCaT). A viabilidade celular foi determinada através do ensaio MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), seguindo procedimentos previamente descritos (NOGUEIRA et al., 2011). As células foram mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ em meio DMEM (Meio Eagle Dulbecco Modificado) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS). Quando obtida uma confluência aproximada de 80%, foram tratadas com uma solução de Tripsina/EDTA, contadas em microscópio óptico para ajuste da densidade celular a 1×10^5 células/ml e então transferidas para placas de 96 poços. Finalizado o tempo de incubação necessário para a formação da monocamada, concentrações crescentes das amostras de fármaco, óleo e as formulações NCMUPOEA e NCOEA foram colocadas em contato com as células e, após 24 h de incubação, foram realizados os ensaios de viabilidade celular para determinar o potencial citotóxico.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

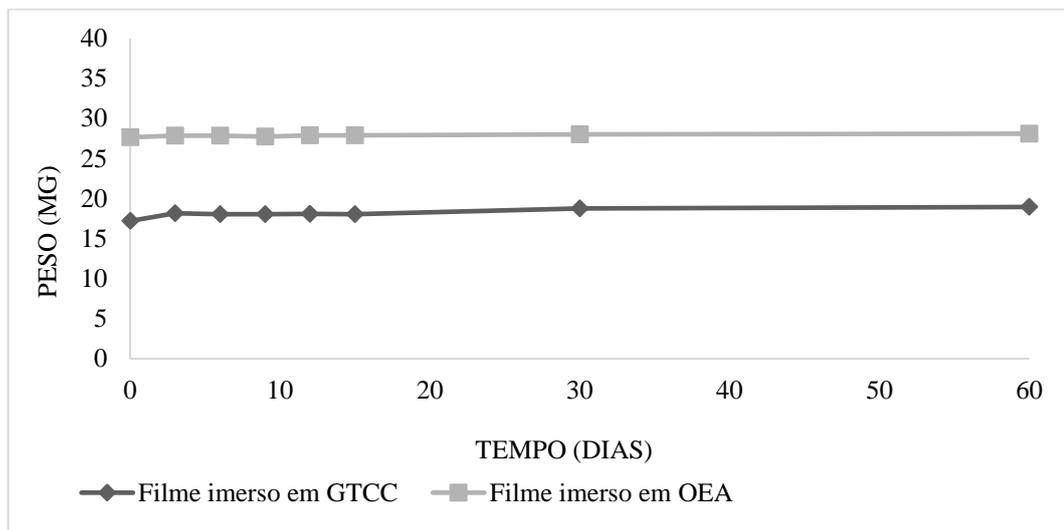
Os resultados foram analisados utilizando o teste t de *Student* para os estudos de biofilme e ANOVA de uma via seguido de teste de Dunett para os ensaios de citotoxicidade. O nível de significância foi fixado em 5%. Os gráficos foram construídos no software *Graphpadprism* 6.01 (Graphpad Software, INC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

Antes do preparo das nanocápsulas, através do método de nanoprecipitação do polímero pré-formado, determinou-se a solubilidade do fármaco no óleo essencial de alecrim. A solubilidade da mupirocina neste óleo é de 263,8 mg/mL. Quanto ao inchamento de polímero, o teste mostrou que o peso do polímero permaneceu constante durante 60 dias. O objetivo deste estudo foi determinar a possível solubilização do PCL no OEA e no GTCC, uma vez que a parede polimérica quando dissolvida no núcleo oleoso pode resultar na formação de uma nanoemulsão (FLORES, 2011). O PCL apresentou pequena interação com o óleo essencial testado e com o GTCC que foi utilizado como núcleo oleoso nas NCB, indicando que a parede polimérica não seria dissolvida com esses óleos (Figura 1).

Figura 1 - Teste de inchamento de polímero (n=3)



Após o preparo das nanocápsulas, suas características físico-químicas foram avaliadas e estão representadas na Tabela 1. Todas as formulações apresentaram tamanho de partícula inferiores a 300 nm e um bom perfil de distribuição monomodal. Os tamanhos de partícula foram $291,43 \pm 1,25$ nm, $286,03 \pm 1,23$ nm e $280,16 \pm 1,76$ nm para as NCMUPOEA, NCOEA e NCB, respectivamente. A faixa de índice de polidispersão (PDI) encontrada para as formulações foi de 0,22 a 0,26, indicando um tamanho de sistema uniforme para as formulações. Valores de PDI inferiores a 0,5 são apropriados para suspensões coloidais, demonstrando que o tamanho de distribuição das nanocápsulas é homogêneo (KUMAR, 2015; WU; ZHANG; WATANABE, 2011). A formulação NCMUPOEA apresentou um pH de 4,5. Já as formulações NCOEA e NCB apresentaram respectivamente valores de pH 5,6 e 5,7. Estes valores podem ser justificados pela natureza ácida do fármaco e devido a utilização de PCL em

torno do núcleo oleoso. Geralmente, o pH de nanocápsulas poliméricas variam de 3,0 a 7,5 quando preparadas de acordo com o método de nanoprecipitação (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

A quantificação de mupirocina presente nas formulações foi realizada após 15 minutos de extração, utilizando acetonitrila como solvente. O teor médio de fármaco para NCMUPOEA foi $95,07 \pm 0,18\%$.

Tabela 1 – Características físico-químicas das nanocápsulas de mupirocina e óleo essencial de alecrim (NCMUPOEA), nanocápsulas de óleo essencial de alecrim (NCOEA) e nanocápsulas brancas (NCB)

Amostras	Tamanho de partícula ^b ± S.D.(nm)	Potencial Zeta ^b (mV)	pH ^b	Eficiência de encapsulação ^b (% w/w)	Teor ^b ± S.D. (%)
NCMUPOEA	291,43	-30,17	4,5	99,05	95,07
	± 1,25 (0,26) ^a		± 0,15		± 0,18
NCOEA	286,03	- 31,33	5.6	-----	-----
	± 1,23 (0,23) ^a		± 0,21		
NCB	280,16	- 38,93	5.7	-----	-----
	± 1,76 (0,22) ^a		± 0.15		

^a índice de polidispersão ^b valor referente a média de 3 amostras

CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Os compostos majoritários presentes no óleo foram identificados com base na comparação com os espectros de massas disponível na biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (NIST) e por comparação dos índices de retenção linear calculados com aqueles disponíveis na literatura científica. A quantidade percentual relativa de cada composto identificado (Tabela 2) foi obtida a partir da área do pico obtida no detector FID.

Tabela 2- Análise qualitativa do OEA e quantidade percentual relativa dos principais compostos identificados.

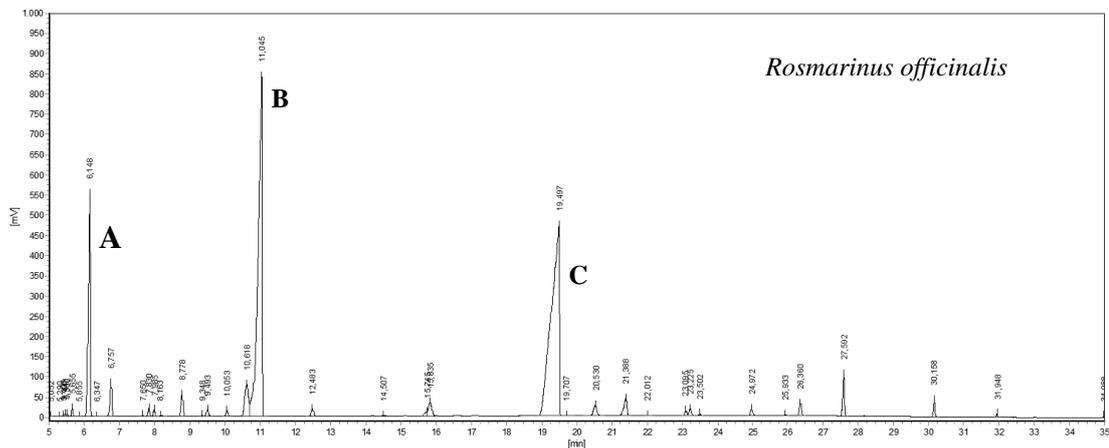
Compostos	Quantidade % relativa
alfa-Tujeno	0,28
alfa-Pineno*	10,45
Camfeno	2,78

Mirceno	0,97
alfa-Felandreno	0,33
alfa-Terpineno	0,28
p-cimeno	3,17
1,8-Cineol*	36,04
gamma-Terpineno	0,39
Linalol	1,10
Cânfora*	40,33
iso-Borneol	0,88
endo-Borneol	1,42
alfa-Terpineol	0,39
acetato de bornil	1,85
β -Cariofileno	0,63

***compostos majoritários**

O OEA utilizado para produzir as nanocápsulas poliméricas, apresentou cânfora, 1,8-cineol e α -pineno como compostos majoritários (Figura 2). Yang e colaboradores (2011), em estudo da composição química de *Rosmarinus officinalis* óleo essencial, também encontraram estes três componentes como sendo os majoritários. Na figura 2, está demonstrado o cromatograma obtido com o óleo essencial de alecrim.

Figura 2- Cromatograma obtido com o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), e seus componentes majoritários: A (α -pineno), B (1,8-cineol) e C (cânfora).



Segundo metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira (2010), o teor mínimo dos compostos α -pineno, canfeno, cineol e cânfora presentes no cromatograma, devem ser 9%, 2,5%, 16% e 5%, respectivamente. Neste caso, o OEA utilizado no presente estudo, é apropriado para a produção das nanocápsulas poliméricas.

ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL PRESENTE NAS NANOCÁPSULAS

As formulações NCMUPOEA e NCOEA foram submetidas a análises por GC para quantificação dos componentes majoritários presentes no OEA após a técnica de preparo. A quantidade percentual relativa de cada componente e os cromatogramas que os representam estão expressos na Tabela 3 e na Figura 3, respectivamente. A extração do OEA foi realizada no dia do preparo das NC, 15 e 30 dias após.

Tabela 3- Valores percentuais dos componentes majoritários do OEA (*Rosmarinus officinalis*) encontrados nas nanocápsulas em comparação a porcentagem encontrada no óleo livre.

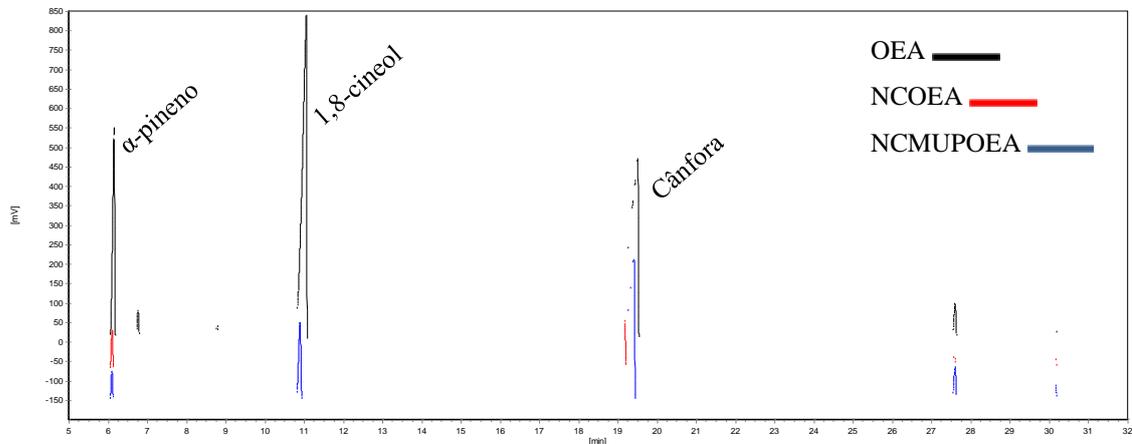
		0 dias		15 dias		30 dias	
		Valor (%)		Valor (%)		Valor (%)	
OEA livre	NCOEA	α -pineno (A)	18,11	Ambiente	A	10,00	8,57
					B	1,39	1,22
					C	13,44	11,13
α -pineno 10,45%	NCOEA	1,8-cineol (B)	1,75	Geladeira	A	14,24	12,32
					B	1,67	1,35
					C	14,44	11,29
1,8-cineol 36,04%	NCMUPOEA	α -pineno (A)	11,55	Ambiente	A	9,15	6,77
					B	11,18	8,15
					C	59,08	39,72
Cânfora 40,33%	NCMUPOEA	1,8-cineol (B)	12,80	Geladeira	A	10,39	7,33
					B	11,71	8,45
					C	59,31	37,94

Através dos resultados obtidos nesta análise, observamos que os componentes do OEA responsáveis pela atividade antimicrobiana estão presentes após o final do processo de produção das nanocápsulas, processo esse que envolve variações de temperatura e vácuo.

Todos os componentes majoritários das formulações armazenadas em geladeira, com exceção da cânfora na NCMUPOEA, apresentaram uma menor redução após 30 dias de armazenamento. Na NCMUPOEA, a quantidade de cânfora encontrada na formulação foi maior quando comparada com NCOEA. Este mesmo composto apresentou em torno de 40% de redução após 30 dias de preparo da formulação NCMUPOEA tanto no seu armazenamento em geladeira quanto em temperatura ambiente. Já na NCOEA, a variação do teor de cânfora, após 30 dias, foi de aproximadamente 26%. Quanto ao teor de α -pineno, ambas as formulações apresentaram uma redução maior quando armazenadas em temperatura ambiente, nos diferentes tempos de análise. O teor de 1,8-cineol apresentou uma redução inferior à 37% para ambas as formulações e condições de armazenamento após 30 dias.

Dessa maneira, conclui-se que a melhor forma de armazenar as formulações desenvolvidas para que haja uma maior conservação de seus componentes majoritários é sob refrigeração.

Figura 3- Cromatogramas referentes ao OEA (*Rosmarinus officinalis*), óleo extraído da NCOEA e da NCMUPOEA no tempo zero dias.



Podemos observar através destes cromatogramas que, ainda que haja uma redução quantitativa dos componentes, qualitativamente os componentes majoritários estão presentes após a produção das nanocápsulas.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Determinação da concentração inibitória mínima

As CIMs são definidas como a concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que é capaz de inibir o crescimento visível de um microrganismo, sendo que a técnica de diluição, utilizada para a realização desse ensaio, é considerada o “padrão ouro” para a determinação da suscetibilidade de micro-organismos (DAVIDSON e PARISH, 1989; ANDREWS, 2001).

Após a produção de inóculos das estirpes de *Staphylococcus aureus* (ATCC 00039, ATCC 29213 e isolado clínico), a CIM dessas bactérias foi determinada. A técnica de microdiluição em placas de 96 poços foi utilizada e o ensaio foi revelado com 2,3,5 cloreto de trifeniltetrazólio. Os resultados encontrados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores da CIM (g/mL) para as diferentes estirpes de *Staphylococcus aureus* frente ao óleo essencial de alecrim (OEA), nanocápsula contendo o óleo (NCOEA), nanocápsula contendo óleo e mupirocina (NCMUPOEA), nanocápsula branca (NCB) e mupirocina livre (MUP).

Amostra	<i>S. aureus</i> (ATCC 00039)	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	<i>S. aureus</i> Isolado clínico
Valores da CIM (g/mL)			
OEA	28,9	28,9	57,8
NCOEA	3,5	3,5	6,9
NCMUPOEA	5,4 x10 ⁻³ (OEA) 1,9 x10 ⁻⁴ (MUP)	2,7 x10 ⁻³ (OEA) 9,8 x10 ⁻⁵ (MUP)	5,4 x10 ⁻³ (OEA) 1,9 x10 ⁻⁴ (MUP)
NCB	SA*	SA*	SA*
MUP	3,1 x10 ⁻⁴	9,8 x10 ⁻⁵	1,9 x10 ⁻⁴

SA* = sem atividade

Na determinação do CIM (Tabela 4) foi observado que a nanoencapsulação do OEA apresentou um resultado melhor quando comparado com o OEA na forma livre, ou seja, quando nanoencapsulado o OEA precisa de uma concentração menor para inibir o crescimento dessas estirpes bacterianas. Alguns casos de aumento da atividade antimicrobiana após a incorporação em nanopartículas são relatados (PAL et al, 2007; SANTOS et al, 2014). Além disso, estudos através da técnica de microscopia de força atômica sugerem que as nanopartículas danificam a parede celular do microrganismo, permitindo assim a entrada de ativos que podem interagir com macromoléculas, proteínas e DNA, afetando dessa maneira os mecanismos de replicação e processos celulares (Ren et al, 2009).

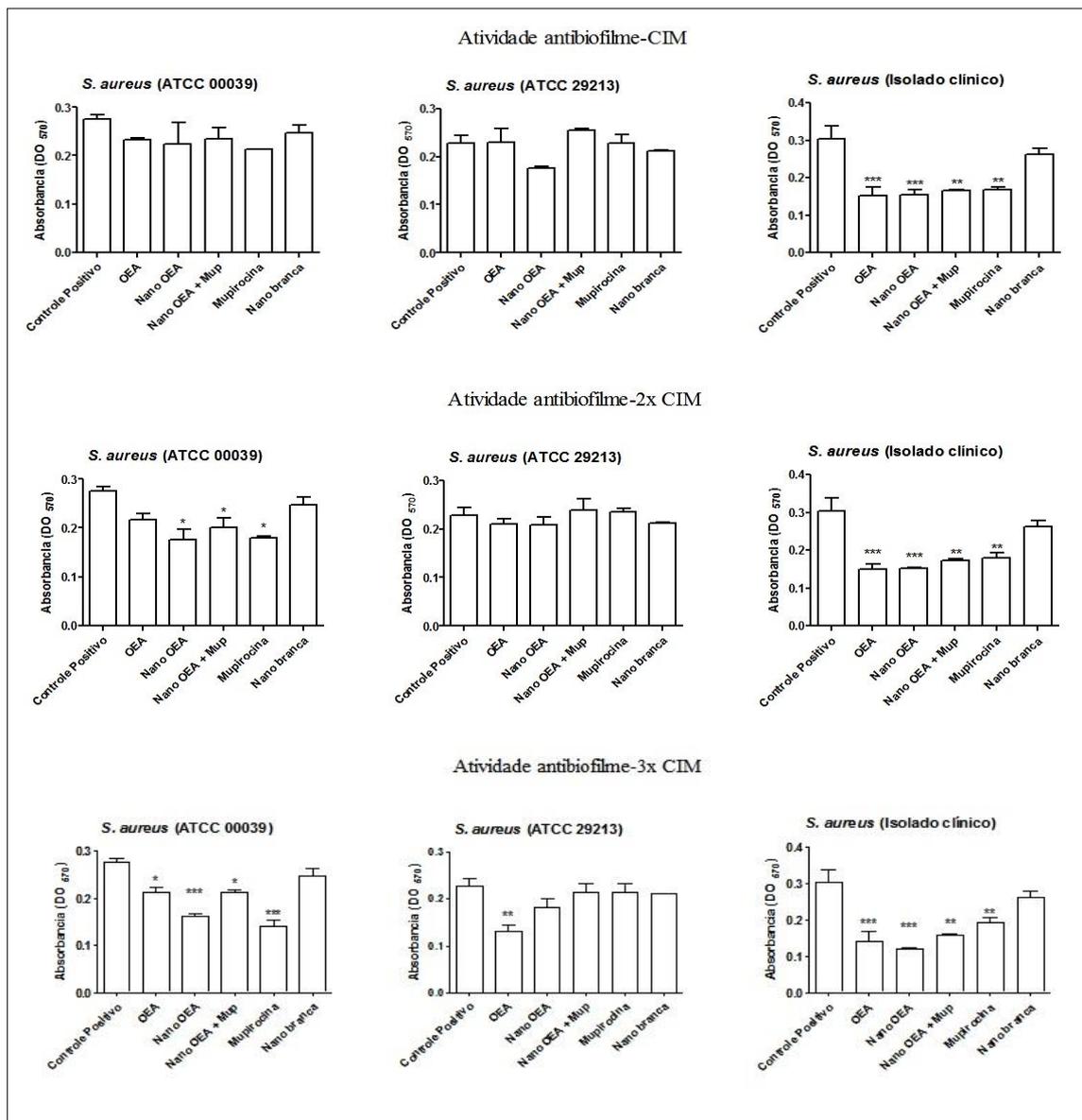
Quando OEA e MUP estão associados e nanoencapsulados (NCMUPOEA), pode-se perceber uma melhora na atividade do OEA e da mupirocina para a ATCC 00039, onde foi necessária uma quantidade menor de óleo e fármaco para inibir o crescimento desses microrganismos. Este dado pode ser devido ao efeito sinérgico dos compostos para esta estirpe.

Determinação da concentração mínima de erradicação do biofilme

Assim como o ensaio de CIM, este ensaio foi realizado em placas de 96 poços. O método mais utilizado para comparar e quantificar o desenvolvimento de biofilmes é o da coloração por cristal violeta. Neste caso, o cristal violeta se liga proporcionalmente à biomassa do biofilme, sendo uma técnica relativamente rápida, com baixo custo e um alto rendimento com

microplacas (O'TOOLE e KOLTER, 1998; LI et al, 2003; PITTS et al, 2003). Após 24 horas de formação do biofilme, a influência das amostras foi testada e os resultados obtidos através da leitura da absorbância das placas em leitor de ELISA em 570nm. Os valores das absorbâncias foram usados para produzir os gráficos (Figura 4).

Figura 4 - Gráficos demonstrativos da atividade antibiofilme encontrada utilizando as amostras em concentrações de CIM, 2x CIM e 3x CIM.



A influência das formulações foi avaliada após 24 horas de formação dos biofilmes. As concentrações que apresentaram redução no biofilme foram mais elevadas em comparação aos resultados apresentados no CIM (Tabela 4). Isso ocorre porque há a produção de uma matriz de exopolissacarídeos que envolve o biofilme, impedindo que os agentes antimicrobianos

alcancem as bactérias mais profundas e tornando o seu interior mais resistente (TEITZEL e PARSEK, 2003).

ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Para determinar o potencial citotóxico das nanocápsulas, foram realizados ensaios de viabilidade celular. Os resultados obtidos para fibroblastos da linhagem 3T3 e queratinócitos da linhagem HaCaT estão ilustrados nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

Na Figura 5 podemos observar que a linhagem 3T3 quando tratada com fármaco livre apresentou uma viabilidade celular acima de 80%. Com as formulações NCOEA e NCMUPOEA a viabilidade celular foi dose dependente e levemente inferior em comparação ao fármaco livre.

Figura 5 - Viabilidade celular das diferentes amostras em fibroblastos da linhagem 3T3

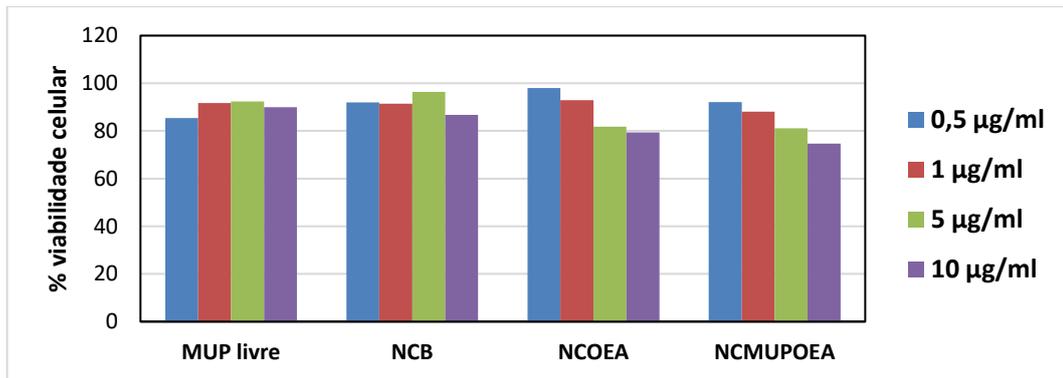
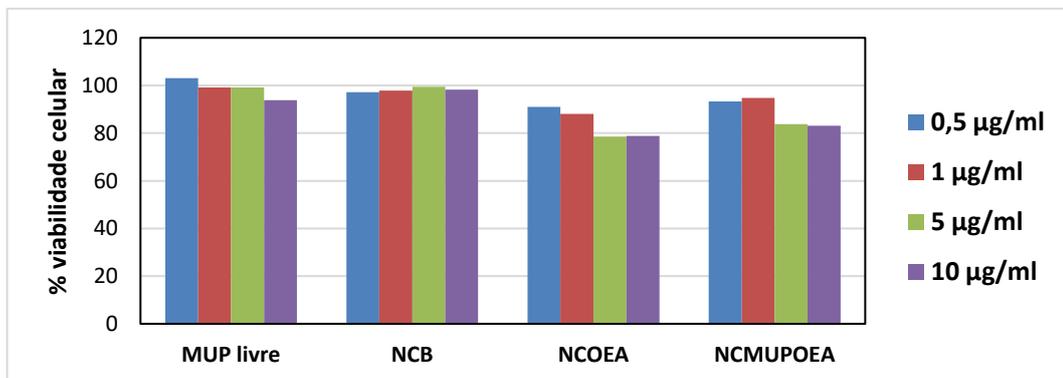


Figura 6 - Viabilidade celular em linhagem HaCaT de queratinócitos humano



Para as células de linhagem HaCaT de queratinócitos humanos (Figura 6), o tratamento com MUP livre proporcionou uma viabilidade celular maior em comparação com a linhagem 3T3 anteriormente testada. Neste caso, as nanocápsulas que são constituídas por OEA também ocasionaram uma diminuição da viabilidade celular nas diferentes concentrações testadas.

Essa leve redução da viabilidade celular pode ser atribuída ao OEA. A atividade citotóxica dos óleos essenciais pode estar relacionada com a capacidade destes de provocar uma despolarização das membranas mitocondriais, afetando canais iônicos, reduzindo o gradiente de pH e alterando a fluidez das membranas, permitindo dessa maneira a entrada de radicais, proteínas e íons, levando a morte celular por apoptose e necrose (BAKKALI et al., 2008; HAMMER et al., 2000). No entanto, todas as nanocápsulas analisadas, em ambas linhagens celulares, induziram apenas uma leve diminuição da viabilidade celular (< 20%), evidenciando, portanto, a potencial aplicação clínica dessas formulações.

CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou resultados positivos através da incorporação da mupirocina e do óleo essencial de alecrim no sistema nanoestruturado. O óleo essencial nanoencapsulado se mostrou mais eficaz do que o óleo essencial livre, quando testado em micro-organismos em sua forma planctômica. A formulação constituída de óleo essencial e mupirocina, precisou de uma concentração menor de fármaco e óleo para inibir o crescimento da estirpe ATCC 00039, mostrando uma possível atividade sinérgica. Para reduzir os biofilmes formados, uma concentração significativamente maior que a CIM teve que ser utilizada. As nanocápsulas mantiveram a viabilidade celular em linhagens celulares de fibroblastos e queratinócitos, evidenciando sua potencial aplicação tópica. Visto a importância de encontrar novas alternativas para combater a resistência microbiana, novos estudos envolvendo outras espécies de micro-organismos formadores de biofilmes devem ser realizados para que a incorporação de óleos essenciais e fármacos passe a ser uma alternativa ao combate desses patógenos.

REFERÊNCIAS

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 5-16, 2001.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils a review. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, p. 446- 75, 2008.

CAVALCANTE, T. T. et al. Effect of lectins from Diocleinae subtribe against oral Streptococci. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 3530-3543, 2011.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. **Clinical and Laboratory Standards Institute – NCCLS**, 2007.

COATES, T.; BAX, R.; COATES, A. Nasal decolonization of *Staphylococcus aureus* with mupirocin: strengths, weaknesses and future prospects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 1, p. 9-15, 2009.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 711-745, 1995.

DAVIDSON, P. M.; PARISH, M. E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. **Food Technol.**, January, p.148-155,1989.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 155-66, 2002.

ELTRINGHAM, I. Mupirocin resistance and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Hospital Infection**, v. 35, n. 1, p. 1-8, 1997.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 14, p. 1456-1459, 2006.

FESSI, H. et al. Jejunal absorption, pharmacological activity, and pharmacokinetic evaluation of indomethacin-loaded poly(d,l-lactide) and poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules in rats. **Int. J. Pharm.**, n. 55, p. R1-4, 1989.

FLORES F. C. **Sistemas Nanoestruturados contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*: Desenvolvimento de formulações e atividade biológica**. 2011. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

HAMMER, K. A., CARSON, C. F.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 355-362, 2000.

HOLBAN, A. M.; GESTAL, M. C.; Grumezescu, A. M. Control of biofilm-associated infections by signaling molecules and nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, n. 510 v. 2, p. 409-418, 2016.

KUMAR, S. et al. Development and evaluation of alginate-chitosan nanocapsules for controlled release of acetamiprid. **Int. J. Biol. Macromolec.**, n. 81, p. 631-637, 2015.

LI, X.; YAN, Z.; XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**, V. 149, n. 2, p. 353-362, 2003.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769-4807, 2011.

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

NAKAMA, T.; NUREKI, O.; YOKOYAMA, S. Structural basis for the recognition of isoleucyl-adenylate and an antibiotic, mupirocin, by isoleucyl-tRNA synthetase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 50, p. 47387-47393, 2001.

NOGUEIRA, D. R. et al. Comparative sensitivity of tumor and non-tumor cell lines as a reliable approach for in vitro cytotoxicity screening of lysine-based surfactants with potential pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 51-58, 2011.

OKEKE, I. N. et al. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. **The Lancet infectious diseases**, v. 5, n. 8, p. 481-493, 2005.

O'TOOLE, G. A.; R. KOLTER. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Mol. Microbiol.**, v. 28, p. 449-461, 1998.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1712-1720, 2007.

PITTS, B. et al. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. **J. Microbiol. Methods.**, v. 54, n. 2, p. 269-276, 2003.

RADULOVIĆ, V.; DE HAAN, G.; KLAUKE, K. Polycomb-group proteins in hematopoietic stem cell regulation and hematopoietic neoplasms. **Leukemia**, v. 27, n. 3, p. 523-533, 2013.

REN, G. et al. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 6, p. 587-590, 2009.

RODRIGUES, F. D. A.; BERTOLDI, A. D. Perfil da utilização de antimicrobianos em um hospital privado. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 1, p. 1239-1247, 2010.

- RODVOLD, K. A.; MCCONEGHY, K. W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: past, present, and future. **Clinical infectious diseases**, v. 58, n. 1, p. S20-S27, 2014.
- ROMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of internal medicine**, v. 272, n. 6, p. 541-561, 2012.
- RUBENICK, J. R. et al. Preparation of mupirocin-loaded polymeric nanocapsules using essential oil of rosemary. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 1, 2017.
- SANTOS, R. C. V. et al. Antimicrobial activity of tea tree oil nanoparticles against American and European foulbrood diseases agents. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 17, n. 3, p. 343-347, 2014.
- SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future microbiology**, v. 7, n. 8, p. 979-990, 2012.
- SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- SIMOR, A. E.; DANEMAN, N. *Staphylococcus aureus* decolonization as a prevention strategy. **Infectious disease clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 133-151, 2009.
- TEITZEL, G. M.; PARSEK, M. R. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. **Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 2313-2320, 2003.
- VALAPERTA, R. et al. *Staphylococcus aureus* nosocomial infections: the role of a rapid and low-cost characterization for the establishment of a surveillance system. **New Microbiologica**, v. 33, n. 3, p. 223-232, 2010.
- XU, K. D.; MCFETERS, G. A.; STEWART, P. S. Biofilm resistance to antimicrobial agents. **Microbiology**, v. 146, n. 3, p. 547-549, 2000.
- WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 63, p. 456-469, 2011.
- YANG, J. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 63-68, 2011.

5 DISCUSSÃO GERAL

Inicialmente, no presente trabalho foram desenvolvidas três diferentes formulações: nanocápsulas poliméricas contendo mupirocina, nanocápsulas poliméricas contendo óleo essencial de alecrim e nanocápsulas poliméricas contendo estes dois compostos em associação.

As formulações foram desenvolvidas utilizando o método de nanoprecipitação do polímero pré-formado proposto por Fessi e colaboradores (1989) e foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta e pH. Um método cromatográfico por CLAE foi desenvolvido e validado para determinar o teor de mupirocina e a eficiência de encapsulação do fármaco, bem como para avaliar a estabilidade das nanocápsulas frente a temperatura ambiente e a 40 °C durante 30 dias. Os resultados e discussão destes resultados encontram-se no artigo 1.

A seguir, através do mesmo método citado, novas formulações foram desenvolvidas: nanocápsulas poliméricas contendo óleo essencial de alecrim e nanocápsulas poliméricas contendo óleo essencial de alecrim e mupirocina em associação, ambas contendo um volume maior de óleo. A atividade antimicrobiana dessas formulações foi analisada utilizando o método de microdiluição, através dos ensaios de concentração inibitória mínima e determinação da concentração mínima de erradicação do biofilme, frente as estirpes de *Staphylococcus aureus* (ATCC 00039, ATCC 29213 e isolado clínico). Também foi realizada a caracterização do óleo utilizado através da cromatografia gasosa, bem como, a determinação da citotoxicidade das formulações frente a duas linhagens celulares. Os resultados e discussão destes resultados encontram-se no artigo 2.

O desenvolvimento de novos medicamentos e, conseqüente, o tratamento de infecções, vem se tornando um desafio a nível mundial devido a resistência aos antibióticos por parte dos microorganismos, principalmente quando estes apresentam resistência a nível celular e também a nível de biofilme simultaneamente. A resistência a nível celular pode ocorrer quando os alvos dos antibióticos são modificados, as enzimas microbianas inativam estes fármacos ou quando os micro-organismos são capazes de impedir ou reduzir a concentração de antibióticos em suas células (BLAIR, et al., 2015; RIBEIRO, et al., 2016). A nível de biofilme, as células dos micro-organismos se unem formando um agregado, composto por proteínas e polissacarídeos, sendo capaz de muitas vezes apresentar resistência maior aos antibióticos quando comparado aos micro-organismos isolados (BJARNSHOLT, et al., 2013).

Entre os principais dispositivos médicos susceptíveis à formação de biofilmes podemos citar: lentes de contato, dispositivos intrauterinos, válvulas para o coração e cateteres urinários

e venosos, sendo que para estes dispositivos citatos os principais micro-organismos isolados incluem gram positivos *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus* sp. e gram negativos *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo *Candida albicans* (DONLAN, 2001).

A cada ano, estão sendo descobertas novas alternativas para o combate a estes biofilmes, seja pelo desenvolvimento de produtos que contenham associação de fármacos com propriedades já conhecidas ou pelos testes realizados com fármacos denominados antigos. Potente atividade antibacteriana e antifúngica tem sido relatada por parte dos anti-inflamatórios diclofenaco e ibuprofeno, antineoplásicos e antidepressivos (ALEM; DOUGLAS, 2004; ATTILA et al., 2009; NAVES et al., 2010; ULUSOY; BOSGELMEZ-TINAZ, 2013; GOGGIN et al., 2014; RESLINSKI et al., 2015; DEAN; VAN HOEK, 2015). Além disso, pesquisas recentes estão voltadas para a funcionalização de nanopartículas com moléculas sinalizadoras e antimicrobianas. Estudos realizados por Saviuc e colaboradores (2013), demonstraram que alguns óleos essenciais e moléculas derivadas de plantas possuem a capacidade de interferir na proliferação de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Neste mesmo sentido, Iordache e colaboradores (2015) funcionalizaram nanopartículas de magnetita com ácido úsnico, promovendo assim um aumento da atividade antimicrobiana através da redução da concentração inibitória mínima necessária para erradicação de culturas planctônicas e biofilmes.

Inicialmente, foi desenvolvido um método utilizando a cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação da mupirocina nas nanocápsulas preparadas contendo os diferentes óleos. Após serem testadas diferentes condições cromatográficas (proporção de fase móvel, vazão e marcas de colunas) o método foi desenvolvido de acordo com as condições citadas no artigo 1. O método cromatográfico demonstrou ser adequado para finalidade pretendida apresentando linearidade, precisão, especificidade, exatidão e robustez.

Três diferentes formulações foram preparadas utilizando como núcleo oleoso o óleo essencial de alecrim e triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico. Estas formulações apresentaram tamanhos de partículas inferiores a 300 nm com índice de polidispersão menores que 0,5 indicando assim, sistemas uniformes em relação a distribuição das partículas (KUMAR, 2015; WU, ZHANG, WATANABE, 2011).

Após o preparo das nanocápsulas, os teores de mupirocina foram de $100,05 \pm 0,15\%$ para a formulação contendo mupirocina e óleo essencial de alecrim e $99,2 \pm 0,10\%$ para a formulação contendo mupirocina e triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico, indicando não haver degradação do fármaco durante o processo de produção das formulações. A menor eficiência de encapsulação da mupirocina quando utilizamos o triglicerídeo do ácido

cáprico/caprílico como núcleo oleoso, pode ser explicada devido a baixa solubilidade do fármaco no referido óleo (84,61%) fazendo com que a mupirocina migre por processo de difusão da fase oleosa para a fase aquosa.

Com a finalidade de avaliar a estabilidade das formulações desenvolvidas, estas foram expostas a temperatura ambiente e a 40 °C durante 30 dias. Após este período, as formulações apresentaram valores similares do tamanho médio das partículas quando comparadas ao tempo inicial. Por outro lado, as formulações apresentaram redução nos valores de pH quando expostas a 40 °C. Esta redução pode ser explicada pelo aumento das taxas de hidrólises poliméricas, o que contribui para os valores de pH observados (NCMR: 3,67 e NCMT: 3,46) (MALLIN, 1996).

Como já era esperado, os valores de potencial zeta, no tempo zero e após os 30 dias, foram todos negativos, devido a presença de polissorbato 80 na formulação, sendo este tensoativo responsável pela presença de uma densidade superficial de cargas negativas (KUMAR, 2015; MARCHIORI *et al.*, 2010).

No segundo artigo produzido a partir desta dissertação, demonstraram-se os resultados da análise de inchamento do polímero PCL. Após 60 dias de exposição do polímero aos óleos utilizados, observou-se que não houve variação no peso dos filmes poliméricos, indicando assim não haver em um primeiro momento solubilização do polímero nos óleos utilizados.

Neste trabalho também foi realizada a caracterização do óleo essencial de alecrim. Os compostos majoritários encontrados foram α -pineno, 1,8-cineol e cânfora, estando todos estes acima dos teores mínimos, 9%, 16% e 5% respectivamente, preconizados pela Farmacopeia Brasileira (2010). Deste modo, demonstrou-se que o óleo de alecrim pode ser utilizado para o preparo das nanocápsulas.

Após o ensaio de determinação da concentração inibitória mínima, evidenciou-se para todas as estirpes uma maior atividade antibacteriana da mupirocina quando comparada a atividade do óleo essencial de alecrim. Em relação a atividade do óleo quando nanoencapsulado, demonstrou-se um aumento na sua atividade em torno de 8 vezes para todas as estirpes, ficando clara a grande influência do sistema nanoestruturado. Para o *S. Aureus* ATCC 00039, a formulação NCMUPOEA apresentou uma CIM de mupirocina menor quando comparada a mupirocina livre, fato este que pode ser devido ao efeito sinérgico da atividade antibacteriana do óleo essencial de alecrim e do referido fármaco.

De acordo com Pal e colaboradores (2007) e Santos e colaboradores (2014) algumas moléculas apresentam um aumento em sua atividade antimicrobiana quando incorporadas em sistemas nanoparticulados. Ao tratarmos os biofilmes formados por *S. aureus* com as mesmas

concentrações utilizadas no ensaio de CIM, verificamos uma pequena melhora na atividade do OEA para as estirpes ATCC 00039 e 29213. Por outro lado, para *S. aureus* isolado clínico os resultados foram similares.

Posteriormente, os biofilmes foram tratados com as formulações na concentração de 3 vezes a CIM. O OEA quando nanoencapsulado apresentou uma melhora na sua atividade contra a estirpe ATCC 00039. Cabe ressaltar que, foi necessário um aumento de 2 e 3 vezes da CIM na concentração dos compostos frente aos biofilmes para verificarmos atividade, demonstrando haver uma maior resistência das bactérias, quando estas estão na forma de biofilme, frente aos agentes antibacterianos.

Nos ensaios de citotoxicidade demonstrou-se uma mortalidade celular inferior a 20% quando os fibroblastos da linhagem 3T3 e os queratinócitos da linhagem HaCaT foram tratados com mupirocina livre e com as nanocápsulas de OEA e NCMUPOEA. Considerando que a viabilidade celular foi superior a 80%, mesmo após tratamento das células com concentrações de OEA e MUP superiores a CIM, pode-se destacar a potencial aplicação clínica dessas formulações.

6 CONCLUSÕES

- A matéria-prima mupirocina, utilizada para a realização deste trabalho, foi caracterizada e identificada junto a sua Substância Química de Referência através de espectrofotometria na região do infravermelho e da análise térmica de Calorimetria Exploratória Diferencial;
- O óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), utilizado nesse estudo, foi caracterizado por cromatografia gasosa (GC-FID e GC/MS) e apresentou como componentes majoritários α -pineno, 1,8-cineol e cânfora;
- O método desenvolvido por cromatografia a líquido de alta eficiência para análise quantitativa do fármaco mupirocina foi linear, específico, preciso, exato e robusto para a finalidade pretendida;
- As nanocápsulas desenvolvidas apresentaram propriedades físico-químicas compatíveis com o encontrado na literatura e se mostraram estáveis em temperatura ambiente durante 30 dias;
- A atividade microbiológica das NCMUPOEA e NCOEA foi analisada e, tanto para ensaio de CIM quanto para o ensaio de biofilme, encontraram-se resultados positivos que comprovam a melhora da atividade da mupirocina e do óleo essencial de alecrim quando nanoencapsulados;
- A nanotecnologia e a associação de óleo e fármaco utilizada neste trabalho revelam-se como ferramentas importantes no estudo de desenvolvimento de novas formulações capazes de aumentar a atividade antimicrobiana da mupirocina e, conseqüentemente, de diminuir a resistência microbiana.

REFERÊNCIAS

- ABDELWAHED, W. et al. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 15, p.1688-1713, 2006.
- ALEM, M. A.; DOUGLAS, L. J. Effects of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, p. 41-47, 2004.
- ATTILA, C.; UEDA, A.; WOOD, T. K. 5-Fluorouracil reduces biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through global regulator AriR as an antivirulence compound. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 82, p. 525-533, 2009.
- BAI, N. et al. Flavonoids and phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 9, p. 5363-5367, 2010.
- BAINES, P. J. et al. Mupirocin: its chemistry and metabolism. **Mupirocin-a novel topical antibiotic**, London (UK): royal Society of Medicine, p. 13-20, 1984.
- BARRETO, H. M. et al. Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L., **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 290-294, 2014.
- BJARNSHOLT, T. et al. Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed? **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, p. 791-808, 2013.
- BLAIR, J. M. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, p. 42-51, 2015.
- BOMFIM, N.S. et al. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. **Food Chemistry**, v. 166, p. 330-336, 2015.
- BOUCHER, H. W. et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2009.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Assuntos de interesse/ Medicamentos. Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos>>.
Acesso em: 18 jul. 2015.
- BRUNS, D. E. et al. Polyethylene glycol intoxication in burn patients. **Burns**, v. 9, n. 1, p. 49-52, 1982.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p. 223-53, 2004.

CAMPO, J. D.; AMIOT, M. J.; NGUYEN-THE, C. Antimicrobial effect of rosemary extracts. **Journal of Food Production**, v. 63, n. 10, p. 1359-1368, 2000.

CELIK TAS, O. Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 553-559, 2007.

COATES, T.; BAX, R.; COATES, A. Nasal decolonization of *Staphylococcus aureus* with mupirocin: strengths, weaknesses and future prospects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 1, p. 9-15, 2009.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 711-745, 1995.

COUTINHO, H. D. M. et al. Increasing of the aminoglycoside antibiotic activity against a multidrug-resistant *E. coli* by *Turnera ulmifolia* L. and chlorpromazine. **Biological Research for Nursing**, v.11, p. 332-335, 2010.

COUVREUR, P. et al. Nanocapsule technology: a review. **Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.19, p. 99-134, 2002.

DEAN, S. N.; VAN HOEK, M. L. Screen of FDA-approved drug library identifies maprotiline, an antibiofilm and antivirulence compound with QseC sensor-kinase dependent activity in *Francisella novicida*. **Virulence**, v. 6, p. 487-503, 2015.

DERESINSKI, S. Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus*: na evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 562-573, 2005.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881-90, 2002.

DONLAN R.M. Biofilms and Device-Associated Infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 277, 2001.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 30-37, 2003.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 155-66, 2002.

ELTRINGHAM, I. Mupirocin resistance and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Hospital Infection**, v. 35, n. 1, p. 1-8, 1997.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.58, n. 14, p. 1456-1459, 2006.

FERGIE, N. et al. Is otitis media with effusion a biofilm infection? **Clinical Otolaryngology & Allied Sciences**, v. 29, n. 1, p. 38-46, 2004.

FESSI, H. et al. Jejunal absorption, pharmacological activity, and pharmacokinetic evaluation of indomethacin-loaded poly(d,l-lactide) and poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules in rats. **Int. J. Pharm.**, n. 55, p. R1-4, 1989.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.

FLAMINI, G. et al. Main agronomic-productive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and chemical composition of their essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3512–3517, 2002.

FLORES F. C. **Sistemas Nanoestruturados contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*: Desenvolvimento de formulações e atividade biológica**. 2011. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

FLORES F.C. et al. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing Tea Tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, v. 175, n. 3-4, p. 281–286, 2013.

GALINDO, L. A.; PULTRINI, A. M.; COSTA, M. Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 4, p. 436-41, 2010.

GOGGIN, R. et al. Corticosteroids directly reduce *Staphylococcus aureus* biofilm growth: An in vitro study. **Laryngoscope**, v. 124, p. 602-607, 2014.

GONZÁLEZ-LAMOTHE, R. et al. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 8, p. 3400-3419, 2009.

IORDACHE, F. et al. Gamma-cyclodextrin/usnic acid thin Film fabricated by MAPLE for improving the resistance of medical surfaces to *Staphylococcus aureus* colonization. **Appl. Surf. Sci.** v. 336, p. 407-412, 2015.

JAMSHIDI, R.; AFZAL, Z.; AFZALI, D. Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries. **American-Eurasian Journal Agriculture Environment Science**, v. 5, n. 1, p. 78-81, 2009.

KOROLKOVAS, A. Dicionário Terapêutico Guanabara. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 18. ed.; 700 p., 2011.

KÜLKAMP, I. C. et al. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2078- 2084, 2009.

KUMAR, S. et al. Development and evaluation of alginate-chitosan nanocapsules for controlled release of acetamiprid. **Int. J. Biol. Macromolec.**, n. 81, p. 631-637, 2015.

LIMAYEM, I.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Purification of nanoparticle suspensions by a concentration/diafiltration process. **Separation and Purification Technology**, v. 38, n. 1, p. 1-9, 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 512 p. 2002.

MALLIN, M. et al. Biodegradable lactone copolymers. II. Hydrolytics study of ϵ -caprolactone and lactide copolymers. **J. Appl. Polym. Sci.**, n. 59, p. 1289-1298, 1996.

MANGENA, T.; MUYIMA, N. Y. O. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 291-296, 1999.

MARCHIORI, M. L. et ail. Hydrogel containing dexamethasone-loaded nanocapsules for cutaneous administration: preparation, characterization, and in vitro drug release study. **Drug. Develop. Ind. Pharm.**, n. 8, p. 962-971, 2010.

MARTINDALE. The complete drug reference, v. A, 37 ed., 329 p., 2011.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 142-151, 2011.

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

MUPIROCINA: pomada dermatológica. Responsável técnico José Carlos Módolo. Itapira: Cristália, 2013.

NAPOLI, E. M. G.; CURCURUTO, G.; RUBERTO, G. Screening of the essential oil composition of wild Sicilian rosemary. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, n. 4, p. 659- 670, 2010.

NAVES, P. et al. Effects of human serum albumin, ibuprofen and N-acetyl-L-cysteine against biofilm formation by pathogenic *Escherichia coli* strains. **J Hosp Infect**, v. 76, p. 165-170, 2010.

OLUWATUYI, M.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 24, p. 3249-3254, 2004.

OZCAN, M. Antioxidant activity of rosemary, sage, and sumac extracts and their combinations on stability of natural peanut oil. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, n. 3, p. 267–270, 2003.

PÁDUA, M. et al. Biofilme em rinosinusite crônica com polipose nasossinusal: estudo piloto. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 75, n. 6, p. 788-93, 2009.

PAZ, M. B. et al. In vitro antibiofilm activity of fluconazole liposomes. **Disciplinarum Scientia**, v. 14, n. 1, p. 23-33, 2013.

PINTO-ALPHANDARY, H.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 13, n. 3, p. 155-168, 2000.

POOVELIKUNNEL, T.; GETHIN, G.; HUMPHREYS, H. Mupirocin resistance: clinical implications and potential alternatives for the eradication of MRSA. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 10, p. 2681-2692, 2015.

POST, J. C. et al. The role of biofilms in otolaryngologic infections. **Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery**, v. 12, n. 3, p. 185-190, 2004.

POTERA, C. Forging a link between biofilms and disease. **Science**, v. 283, n. 5409, p. 1837-1839, 1999.

PROSSER, B. L. et al. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, n. 10, p. 1502-1506, 1987.

PUTHETI, R. R. et al. Nanotechnology importance in the pharmaceutical industry. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 2, n. 3, p. 027-031, 2008.

RAI, M. et al. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, p. 67-78, 2017.

RAMIREZ, P. et al. Isolation of functional ingredients from rosemary by preparative-supercritical fluid chromatography (Prep-SFC). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 5, p. 1606-1613, 2006.

REAGAN D. R. et al. Elimination of coincident *S. aureus* nasal and hand carriage with intranasal application of mupirocin calcium ointment. **Annals of Internal Medicine**, v. 114, n. 2, p. 101-106, 1991.

REMAGE, G. et al. Our current understanding of fungal biofilms. **Critical Reviews in microbiology**, v. 35, n. 4, p. 340-355, 2009.

RESLINSKI, A.; DABROWIECKI, S.; Glowacka, K. The impact of diclofenac and ibuprofen on biofilm formation on the surface of polypropylene mesh. **Hernia**, v. 19, p. 179-185, 2015.

RICHARDS, J.; REED, C.; MELANDER, C. Effects of N-pyrrole substitution on the anti-biofilm activities of oroidin derivatives against *Acinetobacter baumannii*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 15, p. 4325-4327, 2008.

RUBERTO, G.; BARATA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model system. **Food Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 167-174, 2000.

RUKHOLM, G. et al. Antibacterial activity of liposomal gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*: a time-kill study. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 3, p. 247-252, 2006.

SAGAVE, L. et al. Atividade de diferentes formulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 221-226, 2015.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; MOSQUEIRA, V. C. F. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4, p. 560-575, 2010.

SAVIUC, C. et al. Phenotypic and molecular evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* virulence patterns in the presence of some essential oils and their major compounds. **Lett. Appl. NanoBioSci.** v. 2, n. 1, p. 91-96, 2013.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SELEEM, M.N. et al. Targeting *Brucella melitensis* with polymeric nanoparticles containing streptomycin and doxycycline. **FEMS Microbiology**, v. 294, n. 1, p. 24-31, 2009.

SIMÕES, M.; BENNETT, R. N.; ROSA, E. AS. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Product Report**, v. 26, n. 6, p. 746-757, 2009.

SIMOR, A. E.; DANEMAN, N. Staphylococcus aureus decolonization as a prevention strategy. **Infectious disease clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 133-151, 2009.

SHAILESH, T.; KULKARNI, P. K. Development and Evaluation of Mupirocin Loaded Liposomal Hydrogels for Diabetic Wound Healing Properties. **Indian Journal of Advances in Chemical Science**, v. 2, p. 42-45, 2014.

SILVERSTAIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação **Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos**. 7^a. ed. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos editora S. A, 490 p., 2007.

SIMPSON, N. B. et al. Bactroban ointment in flaring atopic dermatitis. Bactroban (mupirocin), **Proceedings of an International Symposium**. Excerpta Medica, Amsterdam, The Netherlands, p. 171–174, 1985.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 463–470, 2001.

SOUSA, M. E. **Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de óleo de *Melaleuca alternifolia***. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado em Nanociências) -Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2014.

SUTHERLAND, R. et al. Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, n.4, p. 495-498, 1985.

THAKUR, R. A. et al. Electrospun nanofibrous polymeric scaffold with targeted drug release profiles for potential application as wound dressing. **International Journal of Pharmaceutics. Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 364, p. 87-93, 2008.

THE UNITED STATES Pharmacopeia, 35.ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2880 p., 2012.

THOMAS, C. M. et al. Resistance to and synthesis of the antibiotic mupirocin. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 281-289, 2010.

TOMIHAMA, T.; NISHI, Y.; ARAI, K. Biofilm formation and resistance to bactericides of *Pseudomonas syringae* pv. theae. **Journal of General Plant Pathology**, v. 73, n. 3, p. 193-196, 2007.

ULUSOY, S.; BOSGELMEZ-TINAZ, G. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduce the production of quorum sensing regulated virulence factors and swarm in motility in human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug Res (Stuttg)**, v. 63, p. 409-413, 2013.

VAUTHIER, C. et al. Poly (alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. **Advanced Drug delivery Reviews**, v. 55, n. 4, p. 519-548, 2003.

VAN VUUREN, S.; VILJOEN, A. Plant-based antimicrobial studies – methods and approaches to study the interaction between natural products. **Planta Medica-Natural Products and Medicinal Plant Research**, v. 77, n. 11, p. 1168-82, 2011.

VECCHIO, S.; RODANTE, F.; TOMASSETTI, M. Thermal stability of disodium and calcium phosphomycin and the effects of the excipients evaluated by thermal analysis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 24, p. 1111-1123, 2001.

VONBERG R. P. et al. Infection control measures to limit spread of *Clostridium difficile*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 5, p. 2-20, 2008.

WANDERLEY, M.S.O. **Avaliação da atividade antimicrobiana de sistema nanoparticulado contendo Ácido Úsnico**. 2007. 71 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) -Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 63, p. 456-469, 2011.

YOSHIDA, M. I. et al. Thermal behavior study and decomposition kinetics of Amiodarone Hydrochloride under isothermal conditions. **Drug. Dev. Ind. Pharm.** V. 37, n. 6, p. 638-647, 2011.