



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SARAH ROMINI DE LIMA BASTO

**FORMULAÇÃO DE ENXAGUATÓRIO BUCAL CONTENDO EMULSÕES A BASE
DE ÓLEO FIXO DE *Syagrus coronata* (LICURI): CARACTERIZAÇÃO,
AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA, TOXICIDADE E HET-CAM**

Recife

2017

SARAH ROMINI DE LIMA BASTO

**FORMULAÇÃO DE ENXAGUATÓRIO BUCAL CONTENDO EMULSÕES A BASE
DE ÓLEO FIXO DE *Syagrus coronata* (LICURI): CARACTERIZAÇÃO,
AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA, TOXICIDADE E HET-CAM**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Profa^o. Dra. Maria Tereza Dos Santos Correia.

Coorientador: Prof^o. Dr. Márcia Vanusa Da Silva.

Recife

2017

Catálogo na fonte
Elaine C. Barroso (CRB4/1728)

Basto, Sarah Romini de Lima

Formulação de enxaguatório bucal contendo emulsões a base de óleo fíco de *Syagrus coronata* (licuri): caracterização, avaliação antimicrobiana, toxicidade e HET-CAM / Sarah Romini de Lima Basto-2017.

92 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadora: Márcia Vanusa da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2017.

Inclui referências e apêndices

1. Plantas medicinais 2. Licuri 3. Saúde bucal I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orient.) II. Silva, Márcia Vanusa da (coorient.) III. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-432

SARAH ROMINI DE LIMA BASTO

**FORMULAÇÃO DE ENXAGUATÓRIO BUCAL CONTENDO EMULSÕES A BASE
DE ÓLEO FIXO DE *Syagrus coronata* (LICURI): CARACTERIZAÇÃO,
AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA, TOXICIDADE E HET-CAM**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 28 / 11 / 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Ranilson de Souza Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Thayza Christina Montenegro Stamford
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Thiago Henrique Napoleão
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** que é a minha fortaleza.

Desejo dedicar meus sinceros agradecimentos àqueles que, de alguma forma, participaram e colaboraram para a realização deste trabalho, em especial: Às pessoas mais importantes da minha vida, a minha avó **Loíde**, que sempre cuidou de mim e me ensinou a verdade e o caminho que devo seguir, aos meus pais **José Maria** e **Jacilene**, pelo apoio e o incentivo para a realização de todos meus sonhos; Aos meus familiares, por estarem sempre ao meu lado, compartilhando momentos, me apoiado, ajudando com meus filhos, (em especial a meu irmão **Diego**, a minha cunhada **Dani**, ao meu primo **Eduardo** e as minhas primas **Vanessa**, **Débora**, **Priscilla** e minhas tias **Jacira** e **Jacineide**), confiado e acreditado no meu sucesso;

Ao meu grande companheiro, **José Carlos**, há quem muito devo, que mais do que ter me apoiado, esteve comigo durante todas as etapas do trabalho colocando literalmente as “mãos na massa”, pela a sua compreensão incondicional nos momentos mais difíceis e decisivos da minha vida, sempre me ouvindo e ajudando, com muita paciência e amor, proporcionando momentos que me trouxeram muitas alegrias. Aos meus filhos, **Carlos Miguel** e **Sarah Valentina**, sem eles eu não seria metade do que sou, grata por me ensinarem a ser uma pessoa melhor, mais paciente e compreensiva, pelo amor e carinho dedicados, amo muito vocês;

Aos meus amigos pesquisadores, **Túlio Diego**, **Clarissa França** e **Daniel Cavalcanti**, por tudo, pelas conversas, pela atenção, pelas discussões de trabalhos, metodologias, testes, aprendi muito com cada um de vocês, resistiremos até o fim;

À Prof^a **Maria Tereza**, pelo carinho, incentivo, confiança e dedicação sempre demonstrado, por me nortear e acreditar em mim e na minha capacidade;

À Prof^a **Márcia Vanusa**, por sua orientação fundamental, pelo apoio, incentivo, amizade e confiança que sempre demonstrou em mim. Por escolher, em todos os momentos o melhor para meu aprendizado e para minha formação, principalmente pela sua confiança nos momentos mais difíceis e nos contratempos da vida;

À Prof^a **Thayza Stamford**, pelo voto de confiança, pela sua disponibilidade, por ter sentado comigo na bancada e, com isso, despertado em mim um novo sentindo

e empolgação naquilo que sempre amei, o ensino, pesquisa e a extensão;

Ao apoio financeiro e NANOBIOTEC-Brasil da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pelo suporte financeiro, ao CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste), a ANTON PAAR e a OLEOCHEMICALS. Obrigada a todos!

Se não houver frutos, Valeu a beleza das flores; Se não
houver flores, Valeu a sombra das folhas; Se não
houver folhas, Valeu a intenção da semente.

(Henfil)

RESUMO

O emprego de enxaguatórios bucais é um recurso importante na manutenção da saúde oral, uma vez que pode prover as limitações da higienização tradicional mecânica, devido ao maior acesso às bactérias do biofilme dental. A vantagem da utilização de óleos de plantas medicinais como emulsões em produtos é a potencialização de uma gama de propriedades biológicas e organolépticas que podem conferir às formulações, uma vez que podem atuar como agentes antimicrobianos, inibidores da produção de ácidos e sulfetos voláteis por bactérias orais, antioxidantes, antiinflamatórios aromatizantes e flavorizantes simultaneamente. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo desenvolver enxaguatório bucal contendo emulsão de óleo fixo de licuri, caracterizar através de cromatografia gasosa, pH, aspectos macroscópicos e microscópico, potencial zeta, reologia, e tamanhos de gotícula, etc), em seguida, avaliar seu potencial bactericida frente bactérias promotoras de cáries e outras afecções orais (*S. mutans*, *S. salivarius*, *L. acidophilus*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*), bem como analisar sua toxicidade sob *C. elegans*, juntamente com o HET-CAM (umas das análises toxicológicas para regularização de cosméticos pela ANVISA) e estudo de interação pelo método checkerboard. O enxaguatório bucal formulado a base óleo fixo de licuri apresentou resultados promissores, através do diagrama de fases pseudoternário foram plotados 99 pontos dos quais 4 apresentaram-se como microemulsões e 43 como emulsões líquidas, as principais formulações foram caracterizadas, testadas frente suas estabilidades e avaliadas por meio da determinação de suas concentrações inibitórias mínimas (CIM) sob microorganismos envolvidos em patologias orais, onde a concentração mínima foi entre 15 µg/mL. As microemulsões avaliadas apresentaram-se como sistemas translúcidos e estáveis, com o pH entre 6,5 e 7, viscosidade entre 33 a 43 mPa.s, já as emulsões apresentaram-se como soluções líquidas e opacas com coloração branca, pH entre 5,5 e 6,5. Os microemulsões (MEs) testadas, após as 24h iniciais do experimento não apresentaram toxicidade frente *C. elegans*, fazendo com que este tempo tivesse efeito quase que imperceptível inclusive na maior concentração testada. O efeito letal agudo das MEs se tornaram evidente para adulto de *C. elegans* obtendo uma CL₅₀ de 6,41% do óleo de licuri para 72h de experimento. Já as emulsões formuladas, dadas por Enxaguatório bucal propriamente dito, apresentou maior estabilidade, ofereceu sinergia (CIF<0,5) com o óleo essencial de menta (usado como flavorizante), obteve resultados bastante satisfatório na atividade antimicrobiana onde apresentou CIM de 17,5 µg/mL frente *S. mutans* resistente, 17,5 µg/mL frente *S. salivares*, 17,5 µg/mL frente *L. acidófilos*, 15 µg/mL frente *S. aureus*, 15 µg/mL frente *C. albicans*, do qual não houve crescimento. No teste agudo frente *C. elegans* do enxaguatório bucal a base de óleo de licuri e de um enxaguatório bucal comercial (a base de cloreto cetilpiridínio), o enxaguatório a base de licuri apresentou menor toxicidade em relação ao enxaguatório comercial, onde a mortalidade foi de 18% contra 90%, respectivamente. Tal estudo evidenciou o elevado potencial do óleo de licuri promovendo o desenvolvimento de novas tecnologias, formação e capacitação de recursos para uso humano desenvolvendo novas estratégias no estudo frente afecções orais. É neste âmbito acadêmico e social que se justifica tal importância do óleo de licuri.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Licuri. *Syagrus coronata*. *C. elegans*. microemulsão.

ABSTRACT

The use of mouthwashes is an important resource in the maintenance of oral health, since it can provide the limitations of traditional mechanical hygiene because of the greater access to the bacteria of the dental biofilm. A great advantage of the use of medicinal plant oils as emulsions in products is the potentiation of a range of biological and organoleptic properties which they can confer to the formulations, since these oils can act as antimicrobial agents, inhibitors of the production of acids and volatile sulfides by oral bacteria, antioxidants, anti-inflammatories, flavoring and flavoring simultaneously. Thus, this work aimed to develop buccal mouthwash containing fixed licuri oil emulsion, characterize by gas chromatography, pH, macroscopic and microscopic aspects, zeta potential, rheology, and droplet sizes, etc.), then evaluate (*S. mutans*, *S. salivarius*, *L. acidophilus*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*) as well as to analyze its acute and nematocidal toxicity under *C. elegans*, together with HET-CAM (which refers to one of the minimum toxicological analyzes for regularization of cosmetics by ANVISA) and a study of interaction by the checkerboard method. The mouthwash formulated with fixed oil of licuri presented promising results, through the pseudoternary phase diagram were plotted 81 points of which 7 presented as microemulsions and 43 as liquid emulsions, the main formulations were characterized, tested against their stabilities and evaluated by determining their minimum inhibitory concentrations (MIC) under resistant *S. mutans*, where the minimum concentration was 10 µg/mL. The microemulsions were presented as translucent and stable systems with a pH between 6.5 and 7, viscosity between 33 and 43 mPa.s, and the emulsions presented as liquid and opaque solutions with white coloration, pH between 5, 5 and 6.5. The microemulsions (MEs) tested after the initial 24 hours of the experiment did not present toxicity to *C. elegans*, causing this time to have an almost imperceptible effect even in the highest concentration tested. The acute lethal effect of MEs became evident for adult *C. elegans* obtaining a LC50 of 6.41% of the licuri oil for 72h of experiment. On the other hand, the formulated emulsion, given by Mouthwash proper, presented greater stability, offered synergy (FIC <0.5) with the essential oil of mint (used as flavoring agent), obtained quite satisfactory results in the antimicrobial activity where it presented 17.5 µg/mL versus *S. aureus*, 15 µg/mL versus *S. aureus*, 17.5 µg/mL versus *S. salivares*, 17.5 µg/mL *C. albicans*, from which there was no growth. In the acute test against *C. elegans* from the mouthwash with a licuri oil base and a commercial mouthwash (Cepacol), the licuri-based mouthwash showed less toxicity than the commercial mouthwash, where mortality was 18% versus 90 %, respectively. This study evidenced the high pharmacological value of licuri oil, promoting the development of new technologies, training and capacity building for human use, developing new strategies in the study of oral diseases. It is in this academic and social context that such importance is justified for the licuri oil.

Keywords: Medicinal plants. licuri. *Syagrus coronata*. *C. elegans*. microemulsion.

LISTA DE TABELAS

	Artigo 2	
Tabela 1	Fatty acid composition (Mean $\pm$ SD) of <i>S. coronata</i> oils.....	52
Tabela 2	Characterization of Microemulsion (24h, 15 days e 30 days).....	53
	Artigo 3	
Tabela 1	Final composition of mouthwash formulation containing fixed licuri oil...	70
Tabela 2	Physical-chemical characterization of mouthwash formulation.....	71
Tabela 3	Minimum inhibitory concentration (MIC) values of mouthwash on oral microorganisms.....	72
Tabela 4	Punctuation range X Irritation category, basis for the HET-CAM test.....	73

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1	Infrutescência do Licuri.....	20
Artigo 1		
Figura 1	Influência do sistema de liberação controlada de fármacos sobre a sua concentração.....	32
Figura 2	Diferentes tipos de emulsões.....	33
Artigo 2		
Figura 1	Pseudoternary phase diagram for the Licuri oil, tween 80, span 80 and water system.....	53
Figura 2	Effect of toxicity on <i>C. elegans</i> (A), linear regression (B) and acute lethal effect (C).....	54
Artigo 3		
Figura 1	Experimental steps of the HET-CAM test: (A) Egg on the 10th day of incubation after fertilization; (B) Incision for removal of the outer shell above the egg's airspace; (C) Humidification of the protective film of the white membrane chorioallantoic membrane with saline solution; (D) Removal of white membrane; (E) Exposure of the Chorioallantoic Membrane of the egg and application of 200 µL of the control solutions or samples and (F).....	69
Figura 2	Formula used for calculations of irritation in the HET-CAM test.....	69
Figura 3	Rheological behavior of mouthwash formulation.....	71
Figura 4	Mortality rate for the licuri-based mouthwash (MW) and industrial mouthwash Cepacol® (CP) at concentrations of 1%, 5% and positive controls after 24h, 48h and 72h.....	73
Figura 5	Positive control (A), negative control with lauryl solution (B), after exposure to mouthwash (C). Source: Own.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FDA	Food and Drug Administration
AG	Ácidos Graxos
MMA	Ministério do Meio Ambiente
OMS	Organização Mundial de Saúde
ME	Microemulsão
EM	Emulsão
MIC	Concentração Inibitória Mínima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS.....	16
1.1.1	Objetivo Geral.....	16
1.1.2	Objetivos Específicos.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	POTENCIAL FARMACOLÓGICO DAS PLANTAS MEDICINAIS.....	17
2.2	CAATINGA.....	18
2.3	<i>Syagrus coronata</i> (LICURI).....	19
2.4	ÁCIDOS GRAXOS.....	21
2.5	EMULSÕES.....	22
2.6	BIOFILME E MICROBIOTA ORAL.....	23
2.7	CÁRIE DENTAL E <i>Streptococcus mutans</i>	25
2.8	ENXAGUATÓRIOS BUCAIS.....	26
3	RESULTADOS.....	29
3.1	ARTIGO 1 - EMULSÃO E MICROEMULSÃO: NOVOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS NO TRATAMENTO VETERINÁRIO.....	29
3.2	ARTIGO 2 - PSEUDOTERNARY PHASE DIAGRAM OF LICURI ALMOND FIXED OIL (<i>Syagrus coronata</i>): DEVELOPMENT OF MICROEMULSION TO FORMULATION OF AN ORAL SEPTIC PRODUCT.....	44
3.3	ARTIGO 3 - MOUTHWASH WITH LICURI FIXED OIL (<i>Syagrus coronata</i>): CHARACTERIZATION, CHECKERBOARD STUDY WITH ESSENTIAL OIL OF MINT, ANTIBACTERIAL ACTIVITY, NEMATICIDE AND HET-CAM.....	61
4	CONCLUSÃO.....	83
	REFERÊNCIAS.....	84
	APÊNDICES.....	91
	Apêndice 1.....	91
	Apêndice 2.....	92
	Apêndice 3.....	93

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento das propriedades medicinais das plantas pelo homem se estendeu por um longo processo evolutivo, durante o qual, o homem foi observando e selecionando as plantas para garantir sua alimentação e atenuar seus males e doenças. Na atualidade, essa prática ainda persiste, e aproximadamente 80% da população a utiliza como única ou primeira opção de tratamento de doença ou em associação com fármacos sintéticos (SASIDHARAN et al., 2011). No Brasil, o uso da medicina tradicional à base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) mais que duplicou nos últimos anos, especialmente entre 2013 e 2015 e de acordo com o SUS (2016), a procura por estes tratamentos aumentaram o equivalente a 161%.

A Organização Mundial da Saúde reconheceu, em 1976, o potencial dos fitoterápicos e desde 1977 vem recomendando estudos nessa área (Resolução WHA 30.49). Em 1978, através da Resolução WHA 31.33, a organização mundial de saúde (OMS) recomendou uma padronização das plantas medicinais com relação à segurança, eficácia, identificação, purificação e produção. Além disso, estimulou investimentos públicos em plantas medicinais, fato que contribui para a fitoterapia ter um importante papel na saúde, especialmente nos países em desenvolvimento (WHO, 1978).

A utilização da fitoterapia nos Serviços de Saúde e nas Universidades Federais teve início em 1995 pela Resolução 8/88 que foi elaborada pela Comissão Interministerial de Planejamento (CIPLAN). Os fitoterápicos são considerados remédios e sua regulamentação pela ANVISA foi implementada com base nos critérios de regulamentação praticados na Europa. Cerca de 25% dos medicamentos prescritos no mundo são de origem vegetal, com inúmeras finalidades inclusive com a indicação na saúde bucal (ANVISA, 2014).

Na odontologia existe uma preocupação com o desenvolvimento do biofilme bacteriano devido ao seu potencial cariogênico, cujo controle é importante não apenas para prevenção, mas por também abranger o tratamento da cárie, da doença periodontal e manter a saúde bucal. Esse controle pode ser efetivado pelos métodos mecânicos, como escovação e uso de fio ou fita dental, bem como pelo método químico utilizando antibióticos, compostos quaternários de amônio, acetato e gluconato de clorexidina (MARION et al., 2013). Em relação aos métodos químicos, existem ainda os enxaguatórios bucais que controlam o biofilme bacteriano. A clorexidina destaca-se como o antisséptico mais eficiente, entretanto, apresenta efeitos colaterais não desejáveis à longo prazo, como respostas inflamatórias,

genotoxicidade, citotoxicidade e edema (MONFRIN RIBEIRO, 2000; TANOMARU FILHO et al., 2002; AQUINO et al., 2008; MARION et al., 2013).

O emprego de enxaguatórios bucais estabeleceu-se como recurso para a higienização oral, principalmente devido a sua fácil utilização, refrescância, palatabilidade e acesso às bactérias, mesmo em áreas de maior dificuldade, complementando assim as limitações da higiene oral mecânica. Vale salientar que o benefício adjuvante dos enxaguatórios pode ser particularmente importante para usuários com menor destreza ou impossibilidade de realizar uma escovação adequada, como crianças, idosos e enfermos (SOUSA, 2014).

Extratos, óleos de plantas e seus compostos isolados têm apresentado potencial antibacteriano contra vários patógenos orais (CAETANO, 2014; MACHADO; OLIVEIRA, 2014; SILVA, 2014; MOURA, 2015). Estudo realizado com enxaguatórios bucais contendo óleos essenciais apontou eficiência na inibição da produção de sulfetos voláteis por bactérias orais, que são as substâncias de odor desagradável responsáveis pela halitose (BRITTO et al., 2009). Muitos óleos essenciais e fixos compartilham efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (MIGUEL, 2010), propriedades que podem associar valor terapêutico às formulações.

A vantagem da utilização do óleo fixo de licuri é a grande concentração do ácido láurico, do qual é bastante conhecido por suas propriedades nutricionais e por seus benefícios a saúde humana, o ácido láurico é encontrado desde o óleo de coco até o leite materno (CARVALHO; COELHO, 2009; LIEBERMAN; PREUSS, 2006; MIRANDA, 2011). Adicionalmente, a utilização de princípios ativos de origem orgânica em formulação de emulsão e microemulsão podem aumentar a eficiência desses produtos (BASTO et al., 2016). Desta forma, o uso e desenvolvimento de novas tecnologias frente produtos das regiões semiáridas promoverão a valorização dessas regiões no contexto social e acadêmico.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Realizar uma revisão de literatura enfocando emulsões como sistemas de liberação controlada de fármaco e posteriormente formular um enxaguatório bucal contendo óleo de licuri e testar em ensaios biológicos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Formular emulsões e microemulsões com óleo de licuri através do diagrama de fases pseudoternário;
- ✓ Avaliar e selecionar as melhores formulações das emulsões e microemulsões com o óleo fixo de licuri através de aspectos macroscópicos e microscópicos;
- ✓ Testar a estabilidade preliminar das emulsões e microemulsões;
- ✓ Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana das emulsões e microemulsões frente a microorganismos da cavidade bucal;
- ✓ Formular um enxaguatório bucal contendo óleo de licuri e determinar sua caracterização físico-química e o seu potencial sinérgico com o óleo de menta pelo método checkerboard;
- ✓ Avaliar a atividade antibacteriana do enxaguatório bucal sobre microorganismos bucais através da concentração inibitória mínima;
- ✓ Determinar o potencial de irritabilidade e de toxicidade do enxaguatório bucal, comparando-o com enxaguatório comercial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 POTENCIAL FARMACOLÓGICO DAS PLANTAS MEDICINAIS

Planta medicinal é aquela administrada sob qualquer forma e por alguma via ao homem, desempenhando algum tipo de ação farmacológica. As plantas podem ser rotuladas de acordo com sua ordem de importância, dando início pelas plantas utilizadas diretamente na terapêutica, seguidas das que constituem a matéria-prima para manipulação e, por último, das utilizadas na indústria para aquisição de princípios ativos ou como precursores em semi-síntese. As plantas medicinais têm sido tradicionalmente empregadas no tratamento de várias enfermidades e sua aplicação abrange desde o combate ao câncer até aos microrganismos patogênicos (DAGLIA, 2012).

Além do uso na medicina popular com intuítos terapêuticos, as plantas medicinais têm colaborado, ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos vastamente utilizados na clínica, como a emetina, a vincristina, a colchicina e a rutina. A todo momento são relacionadas na literatura novas moléculas, algumas de acentuada ação farmacológica (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Até meados do século XX, as plantas medicinais e seus derivados formavam a base da terapêutica medicamentosa, contudo, a síntese química, iniciada somente no final do século XIX promoveu uma impetuosa fase de desenvolvimento, afetando drasticamente a procura por tratamentos tradicionais. Cerca de 50% dos medicamentos são de origem sintética e em torno de 25% são de origem vegetal isolados ou produzidos por semi-síntese (CALIXTO, 2000; MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Embora o grande aumento da síntese química e dos processos biotecnológicos, aproximadamente 25 % dos medicamentos prescritos nos países industrializados são oriundos das plantas. Os fármacos de origem natural presentes no mercado, são na grande maioria, provenientes das pesquisas científicas de países orientais (ANTONIO; TESSER; MORETTI-PIRES, 2013).

As plantas medicinais têm sido uma inestimável fonte para obtenção de moléculas para serem utilizadas terapeuticamente. Inúmeras substâncias isoladas de plantas permanecem sendo fontes de medicamentos como, por exemplo, os glicosídeos cardiotônicos obtidos da *Digitalis*, usados para insuficiência cardíaca (FARDIN et al., 2016).

Projetos financiados por órgãos públicos e privados vêm sendo instituídos com maior frequência e interesse nos últimos anos. Nos anos 70, nenhuma das grandes companhias farmacêuticas mundiais mantinha programas nesta linha, todavia, atualmente isto tem sido prioridade na maioria delas. Entre os elementos que têm contribuído para o crescente interesse

nas pesquisas está a comprovada eficácia de substâncias originadas de espécies vegetais, como os alcalóides da vinca que apresenta atividade antileucêmica, ou do jaborandi, com atividade antiglaucoma, sendo consideradas infalíveis no tratamento (FOGLIO et al., 2006; FARDELONE; BRANCHI, 2016).

2.2 CAATINGA

A Caatinga, bioma típico do sertão do Nordeste brasileiro, distribui-se, de modo geral, numa região de clima semiárido, que exhibe insolação e temperatura elevada e baixa nebulosidade. Essa região apresenta duas estações do ano bem definidas, sendo uma seca com períodos alongados e uma com chuvas, encurtada, permanecendo desta forma toda a região propensa a grandes períodos de estiagem que reproduzem diretamente nas condições de constância de determinadas populações enraizadas. Em decorrência de todas essas condições, esse território foi demarcado pelo Conselho Nacional de Geografia em 1949 e denominada de Polígono das Secas (DUQUE, 1980). Os impactos dessas circunstâncias ecológicas repercutem na cobertura vegetal e no solo, que normalmente é pouco friável e desgastado.

Localizada entre os paralelos de 2°54'S e 17°21'W (PRADO, 2003), a Caatinga ocupa uma área com cerca de 844.453 km², o equivalente a 11% do território nacional. Essa região apresenta uma das áreas de maior biodiversidade do mundo e se destaca por sua riqueza ambiental, tanto de fauna quanto de flora, com muitas espécies ocorrendo somente neste bioma (AVANCINI; TEGA, 2013). Além disso, a Caatinga apresenta grande heterogeneidade vegetacional caracterizada por diferentes fisionomias e elevado endemismo (AVANCINI; TEGA, 2013).

Com sua vegetação bastante diversificada é representada por cerca de 4.547 espécies, 159 famílias e 1.141 gêneros (FORZZA et al., 2013) e 318 espécies são consideradas endêmicas (PRADO, 2003; TABARELLI; SILVA, 2003; GIULIETTI et al., 2004). Estudos realizados em diferentes estados do Nordeste evidenciam que a vegetação da Caatinga possui grande potencial, além de apresentarem uma grande importância ecológica. Essa formação vegetacional abriga um considerável potencial econômico, com espécies que podem ser utilizadas tanto como forrageiras quanto como frutíferas, madeireiras e de vasto uso medicinal (ALBUQUERQUE, 2000; MAIA, 2004).

Sendo um dos principais biomas brasileiros, a Caatinga exhibe inúmeras espécies que são utilizadas de modo amplo pela população local nas mais variadas atividades, consistindo desta forma, uma realidade contínua ao longo de décadas na região. Esse cenário tem se tornado inquietante, já que além da insuficiente realização de trabalhos análogos à catalogação da

flora nativa, este bioma encontra-se entre os mais modificados e ameaçados pela ação do homem. Em razão disso, tem sido classificado como o bioma brasileiro mais crítico no que se refere à conservação (SOUZA, 2013). O estudo e a conservação da biodiversidade da Caatinga constituem-se num dos maiores desafios do conhecimento científico brasileiro pelo fato da Caatinga ser limitada ao território nacional e também por ser, proporcionalmente, a região menos estudada e menos protegida, onde apenas 1% do seu território encontra-se em unidades de conservação (TROVÃO et al., 2007; ARCOVERDE et al., 2014). Dessa forma, a Caatinga tem sido vitimada por um longo processo de perturbação e deterioração ambiental provocada pelo uso insustentável de seus recursos (TROVÃO et al., 2007; AVANCINI; TEGA, 2013).

2.3 *Syagrus coronata* (LICURI)

O óleo fixo de licuri é extraído da amêndoa da espécie *Syagrus coronata* (Martius) Beccari. (Figura 1) pertencente à família Arecaceae, subfamília Arecoideae, tribo Cocoeae, subtribo Butineae (NOBLICK, 1991). Essa subfamília é a maior entre as Arecoideae, reunindo atualmente 115 gêneros e 1500 a 2800 espécies em todo o mundo (UHL; DRANSFIELD, 1987; HENDERSON et al., 2000). O licuri é uma palmeira nativa das regiões secas e áridas encontrada em todo Nordeste do Brasil e sua cultura é importante para o desenvolvimento socioeconômico das comunidades da região. Como existem limitações do solo e do clima para a agricultura, a exploração do licuri pode ser uma boa fonte de geração de renda (BELVISO et al., 2013).



Figura 1. Infrutescência do Licuri Fonte: Belviso et

O óleo de licuri é extraído da amêndoa presente no fruto do licurizeiro, o qual é vastamente conhecido por seu valor nutricional, por conter nutrientes como cobre, ferro, manganês, zinco, cálcio e magnésio, além de ser rico em betacaroteno. Já a amêndoa contém ferro, manganês e selênio (CREPALDI et al., 2001). Tais propriedades garantem um bom funcionamento dos sistemas nervoso e imunológico, previnem a osteoporose e fortalece os ossos, além de prevenir aterosclerose, problemas cardíacos, artrite reumatóide, infecções, hipoglicemia, inflamações, lúpus, além de outros problemas (GELEJNSE, 1994; HITOSHI et al., 1995; ANJO, 2004; KONOVAL et al., 2004; MORAES; COLLA, 2006).

O óleo do licuri pode ser também usado para produção de biodiesel, na indústria farmacêutica e na indústria de cosméticos. Esse óleo já é considerado o melhor do Brasil para a produção de sabão, no entanto, outras propriedades são raramente exploradas em virtude dos poucos estudos realizados (LEAL et al., 2013).

Sua composição de ácidos graxos é similar à do óleo de coco, razão pela qual possuem benefícios similares. Com propriedade emoliente, o óleo do licuri promove boa espalhabilidade e alta penetração na pele para emulsões, além de também agir na prevenção de feridas e melhorar a elasticidade dérmica. Adicionalmente, apresenta baixa acidez e alta estabilidade, garantindo ampla aplicabilidade. O referido óleo pode ser usado na preparação de emulsões e formulações cosméticas, como aerossóis, cremes, loções, batons, entre outros e ainda ser utilizado diretamente na pele ou nos cabelos (LEAL et al., 2013).

O óleo de licuri apresenta diversos benefícios à saúde devido aos ácidos graxos (AG) de cadeia média nele presentes. Segundo Segall et al. (2004) os três principais ácidos graxos presentes no óleo são o ácido láurico (36%), o ácido caprílico (24%) e o ácido cáprico (14%). Esses ácidos podem ser também utilizados como suplementos alimentares já que auxiliam na redução do acúmulo de gordura. Promovem saciedade, liberam energia e auxiliam no funcionamento do metabolismo, razão pela qual podem atuar no processo de perda de peso (BELVISO et al., 2013).

Sabe-se que o óleo fixo de licuri apresenta capacidade antioxidante (BELVISO et al., 2013), no entanto, existem poucos relatos na literatura, especialmente sobre os óleos de plantas da família Arecaceae. Apenas Belviso et al. (2013) e Silva Bessa et al. (2016) estudaram os óleos voláteis dos frutos do licuri. As atividades biológicas registradas para as espécies de *Syagrus* são raras, sendo *S. coronata* e *S. oleraceae* as espécies mais estudadas (SILVEIRA et al., 2005; HUGHES et al., 2013).

Estudos utilizando ácidos graxos e óleos essenciais extraídos da amêndoa de *Syagrus coronata* mostraram forte atividade contra cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de

material clínico (SILVA BESSA et al., 2016). A atividade antimicrobiana do extrato etanólico do epicarpo/mesocarpo dos frutos e do extrato hexânico das amêndoas frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, foi evidenciada por Silveira et al. (2005). Esses autores ainda relataram que a atividade antibacteriana aumenta com a diminuição da polaridade dos extratos, exceto frente ao *S. aureus*, no qual o extrato etanólico apresentou inibição superior ao microorganismo em comparação com a partição em acetato de etila. Devido a isso foi sugerido que substâncias presentes nos extratos hexânicos são, provavelmente, as principais responsáveis pela atividade antimicrobiana de *S. oleracea*.

2.4 ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos são conhecidos como ácidos monocarboxílicos alifáticos e vulgarmente conhecidos como óleos gordos ou óleos fixos, sendo vastamente distribuídos entre os vegetais e comumente permanecem ligados a açúcares, glicerol e grupos fosfatos para formar lipídios (DESBOIS et al., 2010; RUIZ-RODRIGUEZ et al., 2010; LIMA et al., 2011).

O número de átomos de carbonos dos ácidos graxos variam entre 4 e 28, sendo que aqueles com cadeias contendo número inferior a oito carbonos são referidos como ácidos graxos de cadeia curta e acima de 16 carbonos são designados como de cadeia longa. Independentemente do ácidos graxos eles apresentam em uma de suas extremidades um grupo carboxila e na outra um grupo metila (DESBOIS; SMITH, 2010).

Os ácidos graxos são distribuídos de acordo com o tipo de ligações entre átomos de carbono. Quando possuem apenas ligações simples são referidos como saturados, no entanto se tiverem ligações duplas são designados de acordo com o número delas. São classificados como monoinsaturados os que apresentam uma ligação dupla em toda a molécula e poli-insaturados, quando apresentam mais de uma ligação dupla (DESBOIS; SMITH, 2010; RUIZ-RODRIGUEZ et al., 2010).

Os ácidos graxos apresentam várias atividades biológicas, incluindo antimicrobiana, citotóxica, antioxidante e de sinalização (DESBOIS; SMITH, 2010; MEZNI et al., 2012). A atividade antibacteriana de cada ácido graxo é influenciada por sua estrutura e forma, ressaltando-se que o comprimento da cadeia a presença, o número, a posição e a orientação das ligações duplas interferem em sua atividade (DESBOIS; SMITH, 2010).

2.5 EMULSÕES

São dispersões nas quais a fase dispersa é constituída por pequenas gotículas de líquido distribuídas em um veículo no qual são imiscíveis e podem formar macroemulsões (tamanho das gotículas varia de 100 a 100.000 nm) ou microemulsões (tamanho das gotículas varia de 10 a 100 nm e apresentam transparência). As emulsões podem ter variadas viscosidades e sua consistência varia de líquida a semi-sólida (TEH et al., 2008).

Emulsões apresentam-se como um sistema termodinamicamente instável, portanto, não se formam espontaneamente, sendo necessário fornecer energia para formá-las através de agitação, de homogeneizadores ou de processos de spray. De acordo com a hidrofília ou lipofília da fase dispersante, esses sistemas são classificados como óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) conforme descrito por Teh et al. (2008).

As emulsões são sistemas estabilizados cineticamente pela ação de agentes tensoativos ou emulsificantes também denominados de surfactantes, que são substâncias capazes de diminuir a tensão interfacial do sistema e formar um filme, ao redor dos glóbulos da fase dispersa com propriedades estéricas e eletrostáticas, estabilizando o sistema. Um exemplo de alimento emulsionado é a maionese, na qual a gema de ovo contém o fosfolípido lecitina que estabiliza a emulsão do azeite na água (TEH et al., 2008).

Os tensoativos são compostos por moléculas anfifílicas que se fixam na interface, entre a fase dispersa e a dispersante, tendo a dupla função de reduzir a tensão interfacial e estabilizar o sistema postergando fenômenos de instabilidade que poderão causar a separação das fases do sistema. Os principais fenômenos de instabilidade observados em emulsões são floculação, cremação e coalescência (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 1998).

Devido ao pequeno tamanho de partículas, caracterizam-se como macroscopicamente transparentes ou translúcidas (ZANIN et al., 2002; JAFARI et al., 2008). Alguns aspectos físico-químicos desses sistemas coloidais são determinantes para a estabilidade, que se mostra superior aos sistemas macroemulsionados. Microemulsões são cineticamente mais estáveis (SOLANS et al., 2005).

As microemulsões podem ser formadas por processos de alta energia (dispersão) que fazem uso da energia mecânica ou mecanismos de baixa energia de emulsificação (condensação) que fazem uso da energia química armazenada no sistema. Nos métodos de alta energia de emulsificação, essa é alcançada através de homogeneizadores de alta pressão ou geradores de ultrassom, para promover o cisalhamento capaz de deformar a partícula. A aplicação de alta energia gera forças que podem romper as gotas da fase dispersa, de forma

que a diferença entre as pressões, interna e externa da gota, sejam superadas (SOLANS et al., 2005).

Segundo Thadros et al. (2004) as vantagens das microemulsões como produtos cosméticos ou farmacêuticos são: cobrir extensa área cutânea, devido ao tamanho das partículas, sendo indicados como sistemas para liberação de ativos na pele; podem penetrar através da superfície áspera de peles ressecadas; o pequeno diâmetro das partículas permite a deposição uniforme nos substratos; a molhabilidade, espalhabilidade e penetração podem ser aumentadas como resultado da baixa tensão superficial do sistema e da baixa tensão interfacial das gotículas O/A; aspectos físicos, como transparência e fluidez, e ausência de espessantes podem garantir excelente aspecto estético e sensorial na pele e podem ser substitutas de lipossomas e vesículas que são menos estáveis, permitindo em alguns casos a formação de fases cristalinas lamelares ao redor das gotículas da microemulsão.

2.6 BIOFILME E A MICROBIOTA ORAL

Nos últimos dois milhões de anos, os seres humanos e seus microorganismos comensais evoluíram em conjunto e se tornaram gradativamente dependentes uns dos outros (LEY et al., 2008). No começo da década de 90, pesquisadores e cientistas acreditavam que o sequenciamento do genoma humano seria o suficiente para compreender as bases e os mecanismos de funcionamento do nosso organismo. Entretanto, atualmente é entendido que a análise do genoma humano é apenas uma parcela à composição genética de nossos corpos, em função do vasto microbioma que nos habita (AVILA et al., 2009).

Registros fósseis contribuíram para a conclusão de que os microorganismos se organizavam em comunidades espacialmente organizadas há aproximadamente 3,25 bilhões de anos (ALLWOOD et al., 2006). Essas comunidades, também denominadas biofilmes, iniciam-se com a adesão de colonizadores primários a uma superfície biótica ou abiótica, a partir de sinais específicos como a disponibilidade de nutrientes do meio, temperatura, osmolaridade, pH e concentrações de ferro e oxigênio (O'TOOLE et al., 2000; MARSH, 2010).

A organização inicial é essencialmente controlada por interações iônicas e hidrofóbicas entre a parede celular do colonizador e as moléculas adsorvidas na superfície (MILLEZI, 2012). Após a colonização primária, ocorre a agregação de colonizadores secundários (interação célula-célula) através da liberação de proteínas de adesão e polissacarídeos pelas células aderidas e em seguida pela deposição de multicamadas microbianas (VON SÖHSTEN MARINHO; SILVA ARAÚJO, 2008). O passo seguinte é caracterizado pelo aumento da

densidade celular e espessura do biofilme devido tanto a multiplicação dos microorganismos aderidos quanto pela adesão de novos microorganismos. Por fim, atingida a etapa de maturação desse complexo dinâmico e tridimensional, a massa bacteriana é liberada e os microorganismos desprendidos podem colonizar novos ambientes (MILLEZI, 2012).

Os biofilmes não incluem somente microorganismos, uma vez que são constituídos principalmente de água e matéria orgânica, a qual corresponde todo material extracelular produzido, bem como qualquer material aprisionado dentro da matriz resultante, como partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas (MACÊDO, 2000).

A transição de células planctônicas (livres) para células organizadas em comunidades aderidas a uma superfície gera diversas mudanças e adaptações como a expressão de grandes quantidades de exopolissacarídeos para formação da matriz extracelular, alteração da expressão gênica e indução de um fenótipo do biofilme, resposta a condições de estresse e comunicação com o hospedeiro (MARSH et al., 2011).

O funcionamento e a integridade do biofilme microbiano são determinados pela estruturas dos exopolissacarídeos, os quais agem como adesivos e barreira de proteção, protegendo as células para que não sejam destacadas pelo fluxo de substâncias (KIVES et al., 2006). Assim, os polissacarídeos extracelulares podem cooperar para a patogenicidade do biofilme por aumentar em acúmulo de células sobre sua superfície, promoverem sua estabilização estrutural, facilitarem a difusão de nutrientes entre os microorganismos e dificultarem a penetração de agentes antimicrobianos (BOWEN, 2002; KOO et al., 2009).

Experimentos já demonstraram que microorganismos em biofilmes são menos suscetíveis aos tratamentos convencionais do que microorganismos planctônicos e, na maioria dos casos, células de um biofilme podem se tornar 10 a 1.000 vezes mais resistentes aos efeitos dos agentes antimicrobianos (MAH; O'TOOLE, 2001). Segundo Ren et al. (2005), 40% das proteínas da parede celular de microorganismos em biofilme diferem das proteínas de células planctônicas, resultando na modificação de possíveis sítios específicos de ligação aos antibióticos (MILLEZI, 2012).

Uma das organizações microbianas mais complexas do corpo humano é a microbiota oral, constituída por aproximadamente 700 espécies bacterianas (AAS et al., 2005) e, em menor quantidade, vírus, micoplasmas, fungos e protozoários (MARSH et al., 2011). Na cavidade oral, a qual é quente e úmida, existem diversas superfícies propícias à formação de um biofilme, tais como o esmalte dental, as próprias células epiteliais, os colonizadores

primários ou as superfícies de materiais ortodônticos presentes na cavidade (JENKINSON; LAMONT, 2005).

Essas superfícies possuem macromoléculas hidrofóbicas adsorvidas, como proteínas e glicoproteínas salivares, formando um filme condicionante denominado de película adquirida, o qual é propício à adesão bacteriana (ZANATTA; RÖSING, 2007). Cerca de 80% dos colonizadores primários da cavidade oral são do gênero *Streptococcus* (MARSH, 2010).

Apesar da cavidade oral ser aeróbica, o oxigênio presente é rapidamente consumido pelos colonizadores primários aeróbicos (por exemplo, *Neisseria* sp.) ou anaeróbicos facultativos (por exemplo, *Streptococcus* e *Actinomyces* sp.). Logo, em biofilmes de alta densidade celular como a placa dental, as condições também são favoráveis para colonização de microrganismos anaeróbios, resultando em uma organização espacial precisa de interações bacterianas (AMBROSIO et al., 2008; MARSH et al., 2011).

Com isso, nas camadas mais superficiais do biofilme estão presentes microrganismos aeróbios. Nas zonas de transição prevalecem bactérias facultativas tolerantes a oxigênio, como fermentadoras e desnitrificantes, enquanto que nas partes mais profundas e com potencial redox mais baixo, localizam-se bactérias estritamente anaeróbias, como as sulfato-redutoras e metanogênicas (DAMGAARD et al., 2001; AQUINO et al., 2008).

Vale observar a importância do controle do volume e da complexidade do biofilme oral, uma vez que esses aspectos estão relacionados com doenças periodontais como gengivite crônica e periodontites, halitose, infecções endodônticas, actinomicose e até mesmo à endocardite bacteriana (CHAMBRONE et al., 2009).

2.7 CÁRIE DENTAL E *Streptococcus mutans*

Na presença de equilíbrio, a colonização microbiana dos dentes é benéfica, uma vez que são instituídas relações de simbiose com o hospedeiro e a microbiota atua como uma defesa natural da cavidade bucal contra a instalação de microrganismos patogênicos. Porém, perturbações no habitat microbiano podem gerar relações de patogenicidade através da mudança da composição química do biofilme dental (MARSH; BRADSHAW, 1997).

Em situações de alterações bruscas de pH, baixo fluxo salivar e excesso de nutrientes disponíveis, determinadas espécies como *Streptococcus mutans* podem se utilizar de mecanismos bioquímicos sofisticados que levam sua seleção natural em detrimento das demais espécies microbianas residentes (LEMOS et al., 2005).

Os carboidratos derivados da dieta alimentar, sobretudo sacarose e glucose, estabelecem a principal fonte energética para *S. mutans*, e a metabolização destes substratos geram a

formação de compostos ácidos capazes de reduzir o pH do biofilme até valores abaixo do pH crítico (5,5) de solubilização de hidroxiapatita, principal mineral constituinte do esmalte dental. Este processo tem como consequência a desmineralização da superfície do dente e proliferação bacteriana sobre o tecido lesado, iniciando a instalação da cárie dental (SILVA LEITÃO et al., 2004). No entanto, é importante notar que o processo cariogênico depende da interação de quatro fatores principais, como o hospedeiro (especialmente a saliva e os dentes), a microbiota, o substrato ou dieta e, não menos importante, o tempo (NEWBRUN, 1988).

O processo da lesão cáriosa principiada por *S. mutans* pode ocorrer aderência inicial à superfície dos dentes por meio de glicoproteínas de adesão, seguida da síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis, por meio de enzimas glucosil transferases, que promovem o acúmulo e permanência do microrganismo nas superfícies dos dentes. A alta capacidade para catabolizar carboidratos e produzir ácidos que desmineralizam o esmalte dental e a habilidade para crescer e dar continuidade à metabolização de carboidratos em baixo pH (BURNE, 1998; KURAMITSU, 2003, BANAS, 2004).

Dessa forma, a habilidade de *S. mutans* em sintetizar ácidos orgânicos como produto final da glicólise, sobreviver e proliferar em condições de baixo pH e ainda sintetizar grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares de adesão são considerados fatores de virulência e desempenham um papel crítico no desenvolvimento de sua cariogenicidade (LOESCHE, 1986).

2.8 ENXAGUATÓRIOS BUCAIS

Os mecanismos de ação dos agentes químicos utilizados na saúde bucal são diversos, podendo interferir na adesão bacteriana à superfície do dente, prevenir a proliferação microbiana, remover o biofilme pré-existente, ou ainda, alterar a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis, a qual é um mecanismo particularmente importante na aderência bacteriana (TORRES et al., 2010).

O emprego de enxaguatórios bucais vem se solidificando como recurso especialmente importante na higienização oral, sobretudo devido a alguns benefícios como fácil utilização, refrescância, palatabilidade e acesso às bactérias, mesmo em áreas de maior dificuldade, integrando assim as limitações da higiene oral mecânica. Vale ressaltar que o benefício adjuvante dos enxaguatórios pode ser particularmente importante para crianças e idosos, usuários que, de forma geral, apresentam menor destreza ou impossibilidade de realizar uma escovação adequada (ASADOORIAN, 2006).

O controle químico do biofilme dental bacteriano pelo uso de enxaguatórios bucais ocorrer pela incorporação de substâncias químicas ativas em sua formulação. Essas substâncias devem inibir o estágio de adesão da colonização bacteriana no biofilme dental, comprometendo o crescimento e a atividade metabólica dos microrganismos do biofilme sem, entretanto, intervir em qualquer outro processo biológico (LEITE, 2009). Além disso, a toxicidade de um enxaguatório deve ser baixa, uma vez que tais soluções podem ser eventualmente ingeridas (GUIMARÃES et al., 2006).

Vários agentes químicos com propriedades antimicrobianas e anticariogênicas podem ser encontrados no enxaguatório bucal disponíveis no mercado, como a clorexidina, o cloreto de cetilpiridíneo e o fluoreto de sódio. Dentre esses, a clorexidina é considerada o padrão ouro no controle do biofilme dental (FARDIN et al., 2011). Devido sua natureza catiônica, a clorexidina é rapidamente atraída pela carga negativa da superfície bacteriana e adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas que causam precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas para promover a morte celular (ZANATTA; RÖSING, 2007).

Entretanto, a utilização da clorexidina por mais de 14 dias está associada a sérios efeitos colaterais, como manchas acastanhadas nos dentes, em restaurações ou no dorso da língua, descamação e perda da sensibilidade oral, gosto amargo e interferência na sensação gustativa (FARDIN et al., 2011).

O cloreto de cetilpiridíneo é um composto de amônio quaternário que se liga espontaneamente aos tecidos orais e pode interagir com a membrana celular bacteriana, decorrendo na perda de componentes celulares, perturbação do metabolismo, inibição do crescimento celular e consequente morte bacteriana (ALVES et al., 2012). No entanto, existem relatos de que seu uso prolongado está relacionado com o surgimento de manchas nos dentes e sensação de ardência (ELEY, 1999).

O fluoreto é uma substância reconhecida mundialmente como agente preventivo da cárie dental, sendo encontrado em diversas formulações de enxaguatórios disponíveis no mercado. Substâncias capazes de inibir a produção de ácidos por microrganismos bucais podem ter seus efeitos anticariogênicos potencializados na presença de fluoreto (TRAHAN, 1995), uma vez que esse interfere físico-quimicamente no desenvolvimento da cárie, reduza desmineralização e aumentando a remineralização do esmalte dental (DAWES; TEN CATE, 1990).

Outras substâncias tradicionalmente utilizadas em enxaguatórios bucais são os componentes dos óleos essenciais, como mentol, timol, eucaliptol e salicilato de metila. Segundo a Associação dos Higienistas Dentais do Canadá, a combinação fixa desses

derivados de óleos essenciais demonstrou redução de placa e de inflamação gengival (ASADOORIAN, 2006). Seu uso como enxaguatório bucal foi recomendado pelo Food and Drug Administration (FDA, 2003) como agente antiplaca e antigengivite.

3 RESULTADOS

Os resultados da pesquisa são apresentados em forma de artigos.

3.1 ARTIGO 1 (Publicado)

Medicina Veterinária (UFRPE), v. 10, n. 1-4, p. 25-33, 2016.

**Emulsão e microemulsão: novos sistemas de liberação controlada
de fármacos no tratamento veterinário**

[Emulsion and microemulsion: new controlled release systems of veterinary drugs]

Sarah Romini de Lima **Basto**^{1*}, José Carlos **Ferreira-Silva**², FLA **Silva**¹, GAS **Aleixo**², TCM **Stamford**³, MV **Silva**⁴, MTS **Correia**¹

¹Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil.

²Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, Brasil.

³Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil.

⁴Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil.

*Corresponding author: biologist.sarah@gmail.com

RESUMO

A utilização de forma indiscriminada dos medicamentos veterinários não compromete apenas a eficiência, mas também elevam os custos dos tratamentos, independente da espécie animal. Diante da importância da indústria farmacêutica veterinária para a economia brasileira visando contribuir diretamente para manutenção da saúde e da produtividade animal, com essa revisão objetivou-se abordar sobre novos sistemas de liberação controlada de fármacos, especialmente as emulsões e microemulsões utilizadas no tratamento veterinário. As emulsões são misturas uniformes de pequenas partículas de uma substância num determinado fluído, no qual não é solúvel. Essas emulsões são dispersões coloidais formadas pelas fases dispersa e dispersante, além do agente emulsivo que contribui para estabilizar a emulsão. As microemulsões são sistemas homogêneos pouco viscosos e termodinamicamente estáveis. Apresentam dimensões variando entre a escala micrométrica e nanométrica, transparência ótica, capacidade de veicular fármacos hidrofílicos e lipofílicos, além de serem formadas facilmente pela mistura de seus componentes. Nos sistemas de liberação controlada de fármacos, mesmo utilizando pequenas quantidades de princípios ativos, ocorre uma otimização da ação do fármaco com consequente melhoria de sua biodisponibilidade e diminuição de sua toxicidade, além de facilitar sua administração. Finalizando, os sistemas de liberação controlada de fármacos, como as emulsões e as microemulsões, podem contribuir significativamente para a evolução da terapêutica veterinária por proporcionar o desenvolvimento de fármacos mais eficientes e atender as necessidades da indústria animal moderna.

Palavras chave: Animal, farmacologia, terapêutica.

ABSTRACT

The indiscriminate use of veterinary medicine products compromises not only its efficiency, but also increases treatment costs regardless of animal species. Given the importance of veterinary pharmaceutical industry for Brazilian economy and with a view to contribute directly to maintenance of animal health and productivity, the objective of this review was to analyze new controlled drug release systems, especially emulsions and microemulsions, used for veterinary treatments. Emulsions are uniform mixtures of small particles contained in a particular fluid in which it is not soluble. Such emulsions are colloidal dispersions formed by dispersed and dispersing phases, in addition to the emulsifying agent which contributes to stabilize the emulsion. Microemulsions are homogeneous, non-viscous and thermodynamically stable systems. They exhibit dimensions varying between micrometric and nanometric scale, optical transparency, the ability to transport hydrophilic and lipophilic drugs, besides its ease to be obtained by mixing their components. In controlled drug delivery systems, even using small amounts of active principles, there is an optimized activity of the drug with consequent improvement of its bioavailability and decrease toxicity, thus facilitating its administration. Finally, controlled drug delivery systems, such as emulsions and microemulsions, may contribute significantly to evolution of veterinary therapy by providing more efficient drugs, which meets the needs of modern animal industry.

Keywords: Animal, pharmacology, therapeutics

1. INTRODUÇÃO

A agropecuária é um setor importante para a economia brasileira e somente em 2011 foi responsável por 22,74% do Produto Interno Bruto (IBGE, 2011). Dentre os segmentos que compõem esse setor, a indústria farmacêutica veterinária merece destaque tendo em vista que é diretamente responsável, tanto pela manutenção da saúde e da produtividade dos diversos rebanhos, quanto pela segurança e a abundância do alimento produzidos pelos animais (OMOTE; SLUSZZ, 2013).

O Brasil é um dos cinco maiores mercados de produtos veterinários do mundo e, de um modo geral, esse crescimento tem sido influenciado pelo aumento das exportações de produtos agropecuários, pela maior fiscalização sanitária, pelos critérios cada vez mais exigentes para a comercialização, bem como pela maior conscientização dos criadores da necessidade de manter a sanidade dos rebanhos (CAPANEMA et al., 2007).

Apesar da eficiência dos medicamentos veterinários, a sua utilização de forma indiscriminada compromete não apenas a eficiência, mas também elevam os custos dos tratamentos, independente da espécie animal. No entanto, nos animais de produção, esse cuidado deve ser intensificado, especialmente porque essas substâncias podem ser acumuladas nos tecidos desses animais comprometendo o seu consumo (FREITAS FILHO et al., 2012). Esse fato pode promover desde simples reações alérgicas a quadros graves de intoxicações, além da ingestão de alimentos com resíduos de antibióticos favorecer o desenvolvimento de

resistência bacteriana a determinados fármacos (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000).

Nos últimos anos, a indústria animal moderna tem sido fortemente influenciada por novas exigências de mercado, especialmente no que concerne a qualidade dos produtos e ao bem-estar dos animais (MARTIN; KADOKAWA, 2006; SALLES, 2008). Assim é importante aperfeiçoar os fármacos existentes e desenvolver novas biotécnicas farmacêuticas, como as emulsões e microemulsões, que permitam melhorar a eficiência dos tratamentos farmacológicos.

As emulsões e microemulsões surgem como importantes ferramentas para potencializar o efeito dos fármacos tendo em vista que, mesmo utilizando pequenas quantidades de princípios ativos, os mecanismos de liberação controlada desses fármacos promovem a otimização da entrega do mesmo no local de ação, melhoram sua biodisponibilidade, diminuem o risco de toxicidade e facilitam sua administração (FREITAS FILHO et al., 2012). Adicionalmente, a utilização de princípios ativos de origem orgânica na formulação das emulsões e microemulsões podem aumentar a eficiência desses produtos.

Diante do exposto, objetivou-se abordar sobre novos sistemas de liberação controlada de fármacos, especialmente as emulsões e microemulsões utilizadas no tratamento veterinário.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistemas de liberação controlada de fármacos

Os novos sistemas de liberação controlada de fármacos têm exercido papel importante na expansão da indústria farmacêutica de saúde animal (RATHBONE; MARTINEZ, 2004). As razões fundamentais para o desenvolvimento desses sistemas para uso veterinário são devido a possibilidade de diminuir o stress animal, os custos de produção, bem como minimizar a concentração de princípios ativos na formulação e, dessa forma, tornar os medicamentos mais eficientes por proporcionar o conhecimento da quantidade de substância ativa administrada e ainda reduzir a exposição humana a produtos veterinários (ROTHEN-WEINHOLD et al., 2000).

Nos tratamentos terapêuticos convencionais, pouco tempo após a administração do fármaco, sua concentração aumenta, atinge o clímax e logo depois é reduzida. Dessa forma, cada substância ativa obtém uma faixa de ação terapêutica que entremeia um máximo e um mínimo e fora dessa faixa se torna tóxica ou ineficiente. O principal objetivo dos sistemas de

liberação controlada de fármacos é manter a concentração do medicamento entre estes dois níveis por um tempo prolongado, utilizando uma única administração (Figura 1).

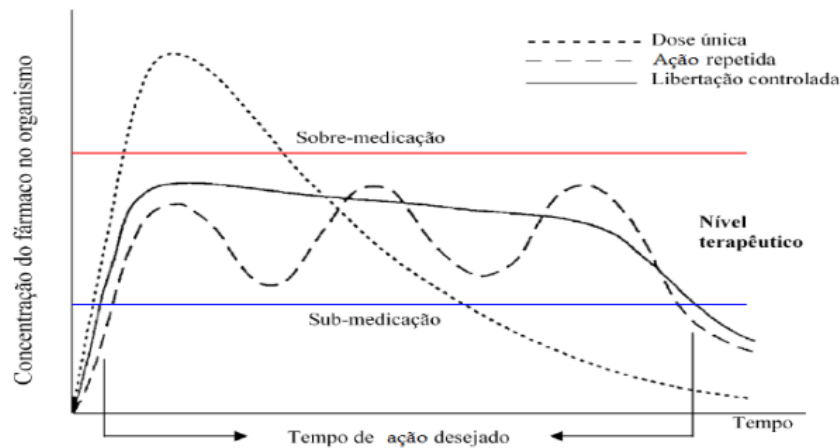


Figura 1. Influência do sistema de liberação controlada de fármacos sobre a sua concentração. Fonte: adaptada de Liberal (2008).

2.2 Emulsões

Emulsões são misturas uniformes de pequenas partículas de uma substância num determinado fluído, no qual não é solúvel. Essas emulsões são dispersões coloidais formadas por uma fase fracionada denominada de interna, dispersa ou descontínua e por outra que circunda as gotículas designada de externa, dispersante ou contínua. Além desses dois componentes existe também o agente emulsivo que contribui para estabilizar a emulsão (SANTOS, 2011). Esse agente, que compõe a interfase, é inserido entre as fases dispersa e dispersante para diminuir a separação (PRISTA et al., 1995).

De acordo com a absorção ou aversão à água da fase dispersante, esses sistemas podem ser classificados como óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), sendo também possível preparar emulsões múltiplas do tipo água/óleo/água (A/O/A) ou óleo/água/óleo (O/A/O), conforme descrito na Figura 2 (PRISTA et al., 1995).

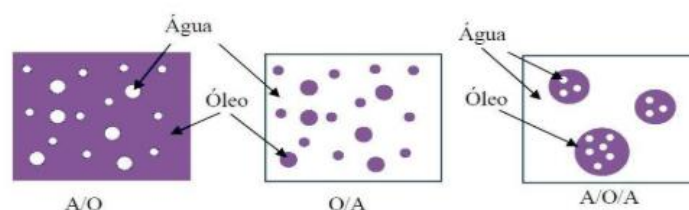


Figura 2. Diferentes tipos de emulsões. Fonte: Santos (2011).

2.3 Microemulsão

As microemulsões são sistemas homo-gêneos, pouco viscosos e termodinamicamente estáveis. Apresentam dimensões variando entre a escala micrométrica e nanométrica, transparência ótica, capacidade de veicular fármacos hidrofílicos e lipofílicos, além de serem formadas facilmente pela mistura de seus componentes (ABOOFAZELI et al., 1994; CONSTANTINIDES et al., 1994; CONSTANTINIDES; YIV, 1995; VAN DEN BOGAARD; TOBBERINGH, 2000), sendo considerados sistemas líquidos ideais para a liberação de fármacos (HO et al., 1996).

Esses sistemas são formados basicamente por óleo, água, tensoativo e cotensoativos em proporções que podem ser definidas através da construção de um diagrama de fases, classificado de acordo com o tipo e o número de componentes utilizados, podendo ser pseudoternário, ternário ou quaternário. A preparação do diagrama definirá as microemulsões que podem ser preparadas com os princípios ativos previamente escolhidos (EL MAGHRABY, 2008).

As microemulsões podem ser administradas por diversas vias, sendo a oral, parenteral, tópica, ocular e nasal as mais frequentes. Atualmente também tem sido estudada a administração desse tipo de formulação através de vias mais modernas como pulmonar, transdérmica e intratecal (KOGAN; GARTI, 2006; ROSSI et al., 2007; TALEGAONKAR et al., 2008).

2.4 Emulsão e microemulsão no tratamento veterinário

O tratamento farmacológico vem sendo aperfeiçoado de maneira exponencial nos últimos anos com o objetivo de atender tanto o desenvolvimento racional da produção animal, quanto a especificidade farmacológica das diferentes espécies, assim como o bem-estar animal (GORNIK, 2005). Dessa forma, substâncias ou princípios ativos já utilizados há décadas como medicamentos, têm sido estudadas para minimizar os efeitos colaterais e potencializar seu mecanismo de ação com menor dano físico, químico, biológico e ecológico (RATHBONE; MARTINEZ, 2004).

O propofol foi introduzido na rotina clínica como agente de indução e manutenção anestésica como alternativa aos barbitúricos, é comercializado na concentração de 10%. Esse fármaco consiste de uma emulsão fina composta por óleo de soja, fosfolípidios de ovo

purificado e glicerol que apresenta aspecto leitoso com pH entre 7 e 8,5 (YUAN et al., 2006; WHITE, 2008; TAMANHO et al., 2013).

A presença de produtos orgânicos sob a forma de emulsão lipídica e a ausência de antimicrobianos torna essa solução mais predisposta à contaminação. Em virtude desse fato, a utilização do propofol como uma microemulsão, constituída pelo sistema óleo/água pronto para uso, mostrou-se estável. Nessa formulação, as partículas hidrofóbicas dispersas apresentam tamanho reduzido (1-50nm) com aspecto transparente e viscosidade comparável a de uma solução aquosa (TAMANHO et al., 2013).

Estudo comparativo das respostas cardíacas e metabólicas em felinos, comparando o propofol comercial com a microemulsão de propofol, evidencia efeitos clínicos semelhantes entre as formulações, contudo, os animais submetidos a microemulsão apresentam maior estabilidade cardiorrespiratória durante a indução e a manutenção anestésica (TAMANHO et al., 2013).

Em cães submetidos a mesma avaliação, a farmacocinética não apresenta diferença entre as formulações (CORRÊA et al., 2013), sendo ainda constatado que, devido ao tamanho reduzido de suas partículas, é possível empregar a microemulsão de propofol em regime de infusão contínua (KIM et al., 2007). Além disso, esse fármaco sob a forma de microemulsão apresenta menor afinidade lipídica e menor volume de distribuição, que gera maiores concentrações, quando comparada à emulsão lipídica (JUNG et al., 2010). Esse fato é sugestivo de que essa microemulsão proporciona maior potência anestésica quando administrada nas mesmas concentrações do fármaco comercial (GEHRCKE et al., 2012).

O metimazol é uma droga utilizada para o tratamento do hipertireoidismos em gatos com idade superior a seis anos (HILL et al., 2011). Na formulação comercial, recomenda-se que seja utilizado duas vezes ao dia por via oral, todavia, além da dificuldade em se administrar comprimidos aos felinos, provoca efeitos adversos, como problemas gastrointestinais, renais e hepatopatias (PETERSON et al., 1988; BECKER et al., 2000; LANGSTON; REINE, 2006; WILLIAMS et al., 2010).

Ao contrário do que ocorre quando o tratamento é realizado com a formulação comercial do metimazol, a grande maioria dos felinos tratados com essa substância na forma de microemulsão apresenta maior tolerância ao tratamento. De um modo geral, quando utilizado na forma de microemulsão lipídica, administrada diariamente por via transdérmica, é eficaz tanto para reduzir, quanto para normalizar a concentração de tiroxina total por até dois anos (HILL et al., 2011).

A Ciclosporina, fármaco também avaliado sob a forma de microemulsão, é um imunomodulador utilizado no tratamento de um número crescente de doenças em caninos e contra a rejeição de órgãos transplantados em cães e gatos (BERNSTEEN et al., 2003; KADAR et al., 2005; ALLENSPACH et al., 2006; GNIRS, 2006). A ciclosporina se encontra disponível em duas formulações orais, sendo uma composta de óleo original e a outra na forma de microemulsão. A formulação em microemulsão é mais utilizada porque melhora a absorção e mantém a concentração plasmática dessa substância por maior período (ARCHER et al., 2014). A microemulsão de ciclosporina apresenta melhores resultados no tratamento da furunculose anal quando comparada a formulação comercial (O'NEILL et al., 2004).

Mesmo sendo escassos, os relatos da utilização de nanoestruturas nas áreas de produção e sanidade animal, um estudo experimental demonstrou maior eficiência da estreptomicina e da doxíciclina quando foram incorporadas a nanoestruturas e testadas frente a isolados de *Brucella melitensis* (TRONCARELLI et al., 2013). Outros pesquisadores verificaram ainda que os fármacos comerciais são menos eficientes do que as nanocápsulas para reduzir a carga bacteriana presente no fígado e no baço de *Mus musculus* infectados (SELEEM et al., 2009).

Estudos preliminares têm mostrado que a utilização de nanocarreadores poliméricos de iodo no tratamento da mastite em ovelhas pode ser uma alternativa ao tratamento convencional (SANTANA et al., 2016). O processo de encapsulamento melhora a estabilidade do óleo, promove a liberação controlada do princípio ativo, reduz a dosagem e aumenta a eficiência dos tratamentos anti-helmínticos (MESQUITA et al., 2013). Anti-helmínticos sob a forma de nanoemulsões ou nanopartículas poliméricas melhoraram a biodisponibilidade dos antiparasitários, como praziquantel e ivermectina (XIE et al., 2011; ALI et al., 2013).

2.5 Emulsão e microemulsão de produtos naturais no tratamento veterinário

O desenvolvimento dos sistemas de liberação controlada de fármacos tem por objetivo melhorar a eficácia dos tratamentos veterinários e minimizar o risco e o custo dos tratamentos. Além disso, a indústria animal moderna requer produtos mais eficientes e ecologicamente correto (MARTIN; KADOKAWA, 2006).

Diante do exposto, existe um crescente interesse nos estudos relativos ao uso de produtos derivados de plantas medicinais de importância veterinária. Sistemas coloidais como as nanocápsulas, nanoesferas, nanoemulsões ou microemulsões e outros sistemas nanoestruturados são objetos de pesquisas sobre novas configurações de carrear e liberar fármacos para locais específicos (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A seleção de uma planta medicinal a ser analisada cientificamente é realizada a partir de um estudo etnofarmacológico, no qual a escolha ocorre de acordo com o uso terapêutico demonstrado por um determinado grupo étnico, fato que também ocorre na etnoveterinária (MACIEL et al., 2002; KONÉ; ATINDEHOU, 2008).

Como descrito anteriormente, as microemulsões são dispersões de óleo em água com as gotículas do princípio ativo estabilizadas por tensoativos e/ou cotesoativos (ANTON et al., 2008). As microemulsões possuem, na sua composição, a presença de um núcleo ou princípio ativo circundado por um dispersante (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009). Esses sistemas submicro-métricos são capazes de promover a diminuição de efeitos tóxicos e aumentar a eficiência terapêutica dos fármacos (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A rodococose equina, doença que acomete o trato respiratório de potros, tem como agente etiológico a bactéria *Rhodococcus equi* (RIBEIRO et al., 2005; MUSCATELLO et al., 2007). O tratamento com antimicrobianos macrolídeos associados com a rifampicina são as principais formas de controle da doença, no entanto, a existência de isolados de *Rhodococcus equi* resistentes a esses compostos vem sendo descrita (GIGUÈRE et al., 2002). Por esse motivo, estudos acerca de novas terapias utilizando plantas medicinais e seus compostos têm sido implementados com a finalidade de obtenção de novos fármacos com ação antimicrobiana (BERTINI et al., 2005).

As microemulsões e as nanocápsulas do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* inibem o crescimento dos isolados do solo e das fezes de *Rhodococcus equi*. Adicionalmente, o uso das nanoestruturas contendo óleo essencial dessa planta em comparação com o óleo essencial puro não nanoestruturado aumenta consideravelmente sua capacidade inibitória (SAGAVE et al., 2015).

O reduzido tamanho dos fármacos, quando associados aos sistemas nanoestruturados, aumentam a eficiência terapêutica. Em suínos, a atividade antimicrobiana da clorexidina associada à nanocapsulas apresenta maior atividade sobre o *Staphylococcus epidermidis* do que os fármacos comerciais (LBOUTOUNNE et al., 2002).

A atividade antifúngica de nanopartículas contendo anfotericina B é superior à do fármaco comercial (PAULO et al., 2010). O aumento da atividade inibitória do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, quando associado a microestruturas em comparação à atividade do óleo puro não nanoestruturado foi igualmente demonstrado (FLORES et al., 2013).

Múltiplos protocolos terapêuticos têm sido instituídos para controlar a sarna psoróptica em coelhos, tanto através do tratamento sistêmico com ivermectina ou moxidectina (FERRERO et al. 1994; WAGNER; WENDLBERGER, 2000), quanto por meio dos

tratamentos tópicos utilizando piretróides ou organofosforados (MELO et al., 2008). Apesar da eficiência dos tratamentos sistêmicos com esses produtos, faz-se necessário levar em consideração seus efeitos adversos nos animais e nos seres humanos em consequência de resíduos presentes nos produtos de origem animal (O'BRIEN, 1999; HANSEN et al. 2005; NERO et al. 2007).

Emulsão formulada com 10% do óleo de nem (*Azadirachta indica*) no controle de *Psoroptes ovis* em coelhos naturalmente infestados é bastante eficaz, especialmente, quando comparada ao tratamento convencional (FERNANDES et al., 2012). Resultados semelhantes são descritos por Dakshinkar et al. (1992) ao utilizarem emulsões formuladas com nem, frutado-conde (*Annona squamosa*) e alho (*Allium sativum*) para o controle desses parasitas.

A ivermectina com uma formulação contendo extratos de nem, Cedro do Himalaia (*Cedrus deodara*) e Vidanga ou falsa pimenta-negra (*Embelia ribes*) no controle do *Psoroptes ovis* em coelhos naturalmente infestados é maior do que o emprego da ivermectina (MASKE; KOLTE, 1999).

A emulsão formulada com o óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis labiatae*) para controle dos sinais clínicos da diarreia neonatal de leitões, apresenta eficiência similar em relação à enrofloxacina, que é o antibiótico de eleição para o tratamento dessa enfermidade (ROSSI et al., 2015). A enrofloxacina inibe, de forma irreversível, a enzima bacteriana girase em curto período de tempo e o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais está relacionado à sensibilização da bicamada fosfolipídica da membrana celular do microrganismo (SINGH et al., 2002).

Considerações Finais

Os fármacos produzidos através de emulsões ou microemulsões apresentam menor risco de proliferação microbiana devido à ausência de substâncias de origem animal na sua composição e maior tempo de armazenamento em consequência da maior estabilidade termodinâmica de sua formulação.

Nos sistemas de liberação controlada de fármacos, mesmo utilizando pequenas quantidades de princípios ativos, ocorre uma otimização da ação do fármaco com consequente melhoria de sua biodisponibilidade e diminuição de sua toxicidade, além de facilitar sua administração.

Finalizando, os sistemas de liberação controlada de fármacos, como as emulsões e as microemulsões, podem contribuir significativamente para a evolução da terapêutica

veterinária por proporcionarem o desenvolvimento de fármacos mais eficientes e atender as necessidades da indústria animal moderna.

3. REFERÊNCIAS

- ABOOFAZELI, R., LAWRENCE, C. B., WICKS, S. R., & LAWRENCE, M. J. Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. III. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-isopropyl myristate and either an alkanolic acid, amine, alkanediol, polyethylene glycol alkyl ether or alcohol as cosurfactant. **International Journal of Pharmaceutics**, v.111, n.1, p.63-72, 1994.
- ALI, M., AFZAL, M., VERMA, M., MISRA-BHATTACHARYA, S., AHMAD, F. J., & DINDA, A. K. Improved antifilarial activity of ivermectin in chitosan–alginate nanoparticles against human lymphatic filarial parasite, *Brugia malayi*. **Parasitology Research**, v.112, n.8, p.2933-2943, 2013.
- ALLENSPACH, K., RÜFENACHT, S., SAUTER, S., GRÖNE, A., STEFFAN, J., STREHLAU, G., & GASCHEN, F. Pharmacokinetics and clinical efficacy of cyclosporine treatment of dogs with steroid-refractory inflammatory bowel disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.20, n.2, p.239-244, 2006.
- ANTON, N., BENOIT, J. P., & SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-a review. **Journal of Controlled Release**, v.128, n.3, p.185-199, 2008.
- Archer, T. M., Boothe, D. M., Langston, V. C., Fellman, C. L., Lunsford, K. V., & Mackin, A. J. Oral cyclosporine treatment in dogs: a review of the literature. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.28, n.1, p.1-20, 2014.
- BECKER, T. J., GRAVES, T. K., KRUGER, J. M., BRASELTON, W. E., & NACHREINER, R. F. Effects of methimazole on renal function in cats with hyper-thyroidism. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.36, n.3, p.215-223, 2000.
- BERNSTEEN, L., GREGORY, C. R., KYLES, A. E., GRIFFEY, S. M., & PATZ, J. Microemulsified Cyclosporine-Based Immunosuppression for the Prevention of Acute Renal Allograft Rejection in Unrelated Dogs: Preliminary Experimental Study. **Veterinary Surgery**, v.32, n.3, p.213-219, 2003.
- BERTINI, L. M., PEREIRA, A. F., OLIVEIRA, C. D., MENEZES, E. A., MORAIS, S. D., CUNHA, F. A., & CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v.17, n.3-4, p.80-83, 2005.
- CAPANEMA, L. X. D. L., SOUZA, J. O. B. D., VELASCO, L. O. M. D., & NOGUTI, M. B. Panorama da indústria farmacêutica veterinária. **BNDES Setorial**, n.25, p.157-173, 2007.
- CONSTANTINIDES, P. P., SCALART, J. P., LANCASTER, C., MARCELLO, J., MARKS, G., ELLENS, H., & SMITH, P. L. Formulation and intestinal absorption enhancement evaluation

- of water-in-oil microemulsions incorporating medium-chain glycerides. **Pharmaceutical Research**, v.11, n.10, p.1385-1390, 1994.
- CONSTANTINIDES, P.P.; YIV, S.H. Particle size determination of phase-inverted water-in-oil microemulsions under different dilution and storage conditions. **International Journal of Pharmaceutics**, v.115, n.2, p.225-234, 1995.
- CORRÊA, A. L., TAMANH, R. B., DE MORAES, A. N., BEIER, S. L., REGALIN, D., FARIA, F. H. & OLESKOVICZ, N. Efeitos clínicos e cardiorespiratórios do propofol em microemulsão em cães. **Ciência Rural**, v.43, n.6, p.1107-1113, 2013.
- DAKSHINKAR, N. P., SHARMA, S. R., KOTHEKAR, M. D., SAPRE, V. A., & GORE, A. K. Effect of crude extracts of three indigenous plants against ear mange of rabbits. **Indian Veterinary Medical Journal**, v.16, n.4, p.288-291, 1992.
- EL MAGHRABY, G.M. Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: effects of cosurfactants. **International Journal of Pharmaceutics**, v.355, n.1, p.285-292, 2008.
- FERNANDES, J. I., VEROCAI, G. G., RIBEIRO, F. A., MELO, R. M., CORREIA, T. R., VEIGA, C. C., & SCOTT, F. B. Eficácia acaricida de uma emulsão contendo 10% de óleo de nim (*Azadirachta indica*) no controle de *Psoroptes ovis* em coelhos naturalmente infestados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.12, p.1253-1256, 2012.
- FERRERO, O., REBUELTO, M., ALBARELLOS, G., & HALLU, R. Efficacy of ivermectin in the treatment of the rabbit ear canker. **Veterinaria Argentina**, v.11, p.242-242, 1994.
- FLORES, F. C., DE LIMA, J. A., RIBEIRO, R. F., ALVES, S. H., ROLIM, C. M. B., BECK, R. C. R., & DA SILVA, C. B. 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.
- FREITAS FILHO, J. R., NASCIMENTO, Á., DA SILVA, A. C., & LINO, F. R. L. Medicamentos Veterinários: contextualizando o ensino de Química Orgânica/Veterinary Medicines: contextualizing the teaching of Organic Chemistry. **Acta Scientiae**, v. 13, n. 2, p. 129-144, 2012.
- GEHRCKE, M. I., DA ROSA, A. C., TAMANHO, R. B., DE MORAES, A. N., & OLESKOVICZ, N. Determinação das doses letal 50 e 100 do propofol em nanoemulsão ou em emulsão lipídica pela via intraperitoneal em camundongos. **Semina: Ciências Agrárias**, p.1911-1917, 2012.
- GIGUÈRE, S., GASKIN, J. M., MILLER, C., & BOWMAN, J. L. Evaluation of a commercially available hyperimmune plasma product for prevention of naturally acquired pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.220, n.1, p.59-63, 2002.
- GNIRS, K. Ciclosporin treatment of suspected granulomatous meningoencephalomyelitis in three dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v.47, n.4, p.201-206, 2006.

- GORNIAC, S.L. O porquê de se prescrever Medicamentos Veterinários. **Revista da ANCLIVEPA-SP**, 2005.
- GALL, Y., PFISTER, P. K., & DIPLEVPC, P. W. B Efficacy of a formulation containing imidacloprid and moxidectin against naturally acquired ear mite infestations (*Psoroptes cuniculi*) in rabbits. **Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v.3, n.4, p.281, 2005.
- HILL, K. E., GIESEG, M. A., KINGSBURY, D., LOPEZ-VILLALOBOS, N., BRIDGES, J., & CHAMBERS, P. The efficacy and safety of a novel lipophilic formulation of methimazole for the once daily transdermal treatment of cats with hyperthyroidism. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.25, n.6, p.1357-1365, 2011.
- HO, H. O., HSIAO, C. C., & SHEU, M. T. Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.85, n.2, p.138-143, 1996.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**. v.37, p.1-55, 2011.
- JUNG, J. A., CHOI, B. M., CHO, S. H., CHOE, S. M., GHIM, J. L., LEE, H. M., & NOH, G. J. Effectiveness, safety, and pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of microemulsion propofol in patients undergoing elective surgery under total intravenous anaesthesia. **British Journal of Anaesthesia**, v.104, n.5, p.563-576, 2010.
- KADAR, E., SYKES, J. E., KASS, P. H., BERNSTEEN, L., GREGORY, C. R., & KYLES, A. E. Evaluation of the prevalence of infections in cats after renal transplantation: 169 cases (1987-2003). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.227, n.6, p. 948-953, 2005.
- KIM, K. M., CHOI, B. M., PARK, S. W., LEE, S. H., CHRISTENSEN, L. V., ZHOU, J., ... & KANG, S. H. Pharmacokinetics and pharma-codynamics of propofol microemulsion and lipid emulsion after an intravenous bolus and variable rate infusion. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v.106, n.5, p.924-934, 2007.
- KOGAN, A.; GARTI, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.123, p.369-385, 2006.
- KONÉ, W.M.; ATINDEHOU, K.K. Ethnobotanical inventory of medicinal plants used in traditional veterinary medicine in Northern Côte d'Ivoire (West Africa). **South African Journal of Botany**, v.74, n.1, p.76-84, 2008.
- LANGSTON, C.E.; REINE, N.J. Hyperthyroidism and the kidney. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.21, n.1, p.17-21, 2006.
- LBOUTOUNNE, H., CHAULET, J. F., PLOTON, C., FALSON, F., & PIROT, F. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly (ϵ -caprolactone) nanocapsule

- encapsulated form and as a digluconate. **Journal of Controlled Release**, v.82, n.2, p.319-334, 2002.
- LIBERAL, J.P.M. **Desenvolvimento e caracterização de comprimidos matriciais de dupla camada contendo Paracetamol**. 2009. 112 f. Dissertação (Mestrado em Controlo de Qualidade, especialidade em Medicamentos e Plantas Medicinais) – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto. 2009.
- MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., VEIGA, J. V., GRYNBERG, N. F., & ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.
- MARTIN, G.B.; KADOKAWA, H. “Clean, Green and Ethical” Animal Production. Case Study: Reproductive Efficiency in Small Ruminants. **Journal of Reproduction and Development**, v.52, n.1, 2006.
- MASKE, D.K.; KOLTE, S.W. Studies on life-cycle of psoroptic mange mite in rabbits and chemotherapy under experimental conditions. **Journal of Veterinary Parasitology**, v.13, n.1, p.45-47, 1999.
- MELO, R. M. D. S., FERNANDES, J. I., VIEIRA, V. P. D. C., RIBEIRO, F. D. A., BOTELHO, M. C. D. S., VEROCAI, G. G., & SCOTT, F. B. Eficácia do piretróide permetrina no controle de *Psoroptes ovis* (Hering, 1838) (Acari: Psoroptidae) em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) naturalmente infestados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n.1, p.55-58, 2008.
- MUSCATELLO, G., LEADON, D. P., KLAY, M., OCAMPO-SOSA, A., LEWIS, D. A., FOGARTY, U., & VAZQUEZ-BOLAND, J. A. *Rhodococcus equi* infection in foals: the science of ‘rattles’. **Equine Veterinary Journal**, v.39, n.5, p.470-478, 2007.
- NERO, L. A., MATTOS, M. R. D., BELOTI, V., BARROS, M. A. F., NETTO, D. P., & FRANCO, B. D. G. M. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.201-204, 2007.
- O'BRIEN, D.J. Treatment of psoroptic mange with reference to epidemiology and history. **Veterinary Parasitology**, v.83, n.3, p.177-185, 1999.
- O'NEILL, T., EDWARDS, G. A., & HOLLOWAY, S. Efficacy of combined cyclosporine A and ketoconazole treatment of anal furunculosis. **Journal of small animal practice**, v.45, n.5, p.238-243, 2004.
- OMOTE, H.D.S.G.; SLUSZZ, T. Prospecção de Mercado visando P&D para Medicamentos Veterinários para Bovinocultura no Brasil. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v.3, n.5, p.129-147, 2013.
- PAULO, C. S., VIDAL, M., & FERREIRA, L. S. Antifungal nanoparticles and surfaces. **Biomacromolecules**, v.11, n.10, p.2810-2817, 2010.

- PETERSON, M. E., KINTZER, P. P., & HURVITZ, A. I. Methimazole treatment of 262 cats with hyperthyroidism. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.2, n.3, p.150-157, 1988.
- PRISTA, L. N., ALVES, A. C., MORGADO, R., & SOUSA LOBO, J. M. Formas farmacêuticas obtidas por divisão mecânica. **Tecnologia Farmacêutica**, v. 1, p. 199-584, 2003.
- RATHBONE, M.J., MARTINEZ, M. Veterinary drug delivery: Part VI. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, n.10, p.1339-1344, 2004.
- RIBEIRO, M. G., SEKI, I., YASUOKA, K., KAKUDA, T., SASAKI, Y., TSUBAKI, S., & TAKAI, S. Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* from foals in Brazil: virulence plasmids of 85-kb type I, 87-kb type I, and a new variant, 87-kb type III. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.28, n.1, p.53-61, 2005.
- ROSSI, C. A., SOARES, M., LUCHESE, F. C., & SANTURIO, J. M. Uso de óleos essenciais no controle dos sinais clínicos das diarreias neonatais em leitões nascidos de fêmeas com diferentes ordens de parto. **Ciência Animal Brasileira**, v.16, n.1, p.93-102, 2015.
- ROSSI, C. G. F. T., DANTAS, T. D. C., NETO, A. A. D., & MACIEL, M. A. M. Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural: Série Ciências Exatas e da Terra**, v.26, n.1-2, p.45-66, 2007.
- ROTHEN-WEINHOLD, A., GURNY, R., & DAHN, M. Formulation and technology aspects of controlled drug delivery in animals. **Pharmaceutical science & technology today**, v. 3, n. 7, p. 222-231, 2000.
- SAGAVE, L., GRESSLER, L. T., FLORES, F. C., SILVA, C. B., VARGAS, A. P. C., LOVATO, M., & BOTTON, S. A. *Melaleuca alternifolia* activity in nanoformulations and terpinen-4-ol against *Rhodococcus equi* isolates. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n.1, p.221-226, 2015.
- SALLES, H.O. Efeito macho: alternativa natural de sincronização do estro para a produção orgânica de caprinos e ovinos. **Embrapa Caprinos e Ovinos. Comunicado Técnico**, 2008.
- SANTANA, R., ZAFALON, L. F., BRANDÃO, H. D. M., AF JUNIOR, G., PILON, L. E., B JUNIOR, W., & MOSQUEIRA, V. C. F. Uso de antimicrobiano nanoparticulado para o tratamento da mastite subclínica de ovelhas de corte no período seco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.9, p.826-830, 2016.
- SANTOS, F.R.A. **Emulsões múltiplas: formulação, caracterização, estabilidade e aplicações**. 2011. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa. 2011.
- SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S., FREITAS, L. L. D. L., & POHLMANN, A. R. 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., JAIN, N., POTHAYEE, N., RANJAN, A., RIFFLE, J. S., & SRIRANGANATHAN, N. Targeting *Brucella melitensis* with polymeric nanoparticles

- containing streptomycin and doxycycline. **FEMS Microbiology Letters**, v.294, n.1, p.24-31, 2009.
- SINGH, N., SINGH, R. K., BHUNIA, A. K., & STROSHINE, R. L. Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157: H7 on lettuce and baby carrots. **LWT-Food Science and Technology**, v.35, n.8, p.720-729, 2002.
- TALEGAONKAR, S., AZEEM, A., AHMAD, F. J., KHAR, R. K., PATHAN, S. A., & KHAN, Z. I. Microemulsions: a novel approach to enhanced drug delivery. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v.2, n.3, p.238-257, 2008.
- TAMANHO, R. B., CORRÊA, A. L., MORAES, A. N. D., BEIER, S. L., REGALIN, D., FARIAS, F. H., & OLESKOVICZ, N. Cardiorespiratory and metabolic answer with microemulsion and lipid emulsion of propofol in cats. **Ciência Rural**, v.43, n.8, p.1435-1442, 2013.
- TRONCARELLI, M. Z., BRANDÃO, H. D. M., GERN, J. C., GUIMARÃES, A. D. S., & LANGONI, H. Mastite bovina sob nanocontrole: A própolis nanoestruturada como nova perspectiva de tratamento para rebanhos leiteiros orgânicos. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, p.124-136, 2013.
- VAN DEN BOGAARD, A.E.; STOBBERINGH, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, n.4, p.327-335, 2000.
- WAGNER, R.; WENDLBERGER, U. Field efficacy of moxidectin in dogs and rabbits naturally infested with *Sarcoptes spp.*, *Demodex spp.* and *Psoroptes spp.* mites. **Veterinary Parasitology**, v.93, n.2, p.149-158, 2000.
- WHITE, P.F. Propofol Its Role in Changing the Practice of Anesthesia. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v.109, n.6, p.1132-1136, 2008.
- WILLIAMS, T. L., PEAK, K. J., BRODBELT, D., ELLIOTT, J., & SYME, H. M. Survival and the development of azotemia after treatment of hyperthyroid cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.24, n.4, p.863-869, 2010.
- XIE, Y., NIU, L., ZHAO, B., WANG, Q., NONG, X., CHEN, L., & YANG, G. Complete mitochondrial genomes of chimpanzee- and gibbon-derived *Ascaris* isolated from a zoological garden in southwest China. **PloS One**, v.8, n. 12, p.e82795, 2013.
- YUAN, Y., LI, S. M., MO, F. K., & ZHONG, D. F. Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam. **International Journal of Pharmaceutics**, v.321, n.1, p.117-123, 2006.

3.2 ARTIGO 2 (Submetido)

Arabian Journal of Chemistry (ISSN: 1878-5352)

Pseudoternary phase diagram of licuri almond fixed oil (*Syagrus coronata*): development of microemulsion to formulation of an oral septic product

Diagrama de fase pseudoternário do óleo fixo de amêndoa de licuri (*Syagrus coronata*): desenvolvimento de microemulsão para formulação de um produto séptico oral.

Sarah Romini de Lima **Basto**^a, Fernanda Luizy Aguiar da **Silva**^a, José Carlos **Ferreira-Silva**^b, Flávia Juliana Lobato de **França**^c, Camila Alexandre de **Luna**^c, Giovanni Amadeu Paiva dos **Santos**^c, Thayza Christina Montenegro **Stamford**^d, Márcia Vanusa da **Silva**^e, Maria Tereza dos Santos **Correia**^e

^aCenter of Bioscience, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil.

^bDepartment of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, Brazil.

^cDepartamento de Zoologia, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil.

^dDepartment of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil.

^eDepartment of Biochemistry, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil.

*Corresponding author: biologist.sarah@gmail.com

ABSTRACT

In Brazil the estimated value spent on phytotherapies is millions of dollars and with exponential growth, due to the change in society's behavior in search of the less synthesized products and with a "Green, Clean and Ethical" trajectory. *Syagrus coronata* popularly known as licuri, is a palm commonly found in dry and arid regions of the Caatinga and has great social and economic importance for the region. Recent studies have shown that the extracts or fractions of this plant have anti-Leishmania, antimicrobial and antioxidant properties in addition to potential for use as biodiesel and topical emulsion as a moisturizer. In this study a microemulsion of the licuri oil was formulated through the pseudoternary phase diagram and for the microemulsion the concentration of the fixed oil of licuri was around 40%, presenting stability for a period greater than 90 days, the microemulsion was tested for acute toxic and lethal activity against *C. elegans*, which at low concentrations were stable, but at concentrations higher than 27% at a time of exposure of 72h showed a toxicity between 6.41%, already in activity resistant *S. mutans* showed inhibitory activity among 10µL/mL. All activities evaluated had promising potential for licuri based products.

Keywords: Medicinal plants, licuri, *Syagrus coronata*, *C. elegans*, microemulsion.

RESUMO

No Brasil, o valor estimado gasto em fitoterápicos é de milhões de dólares e com crescimento exponencial, devido à mudança no comportamento da sociedade em busca dos produtos menos sintetizados e com uma trajetória "verde, limpa e ética". *Syagrus coronata* popularmente conhecida como licuri, é uma palmeira comumente encontrada em regiões secas e áridas da Caatinga e tem grande importância social e econômica para a região. Estudos recentes demonstraram que os extratos ou as frações desta planta possuem propriedades anti-Leishmania, antimicrobianas e antioxidantes além do potencial de uso como

biodiesel e emulsão tópica como hidratante. Neste estudo, uma microemulsão do óleo de licuri foi formulada através do diagrama de fase pseudoternário e, para a microemulsão, a concentração do óleo fixo de licuri foi de cerca de 40%, apresentando estabilidade por um período superior a 90 dias, a microemulsão foi testada quanto a sua toxicidade aguda e atividade letal contra *C. elegans*, que em baixas concentrações foram estáveis, mas em concentrações superiores a 27% em um momento de exposição de 72h mostrou uma toxicidade entre 6,41%, já a atividade bactericida para cepas de *S. mutans* resistente mostrou atividade inibitória entre 10 µL / mL. Todas as atividades avaliadas apresentaram potencial promissor para produtos à base do óleo fixo de licuri.

Palavras-chave: Plantas medicinais, licuri, *Syagrus coronata*, *C. elegans*, microemulsão.

1. INTRODUCTION

The immense Brazilian biodiversity has promoted to phytotherapeutics an important part in the market and also a possibility for the diversification and potentization of the pharmaceutical and cosmetic industry, being an area of priority interest for investments in public and private initiatives (RODRIGUES et al., 2006). Even with the advancement of globalization, industry, and the use of industrialized, medicinal plants products still hold a sizable share of world trade, which is around \$ 14 billion. In Brazil the use of traditional medicine with base medicinal plants by the Unified Health System has doubled in recent years, between 2013 and 2015 the demand for these treatments has increased by 161% (SANTOS et al., 2016), and with exponential growth, due to the change in society's behavior in search of less synthesized products with a "Green, Clean and Ethical" trajectory (MARTIN and KADOKAWA, 2006; FERREIRA-SILVA et al., 2017).

Syagrus coronata (Mart.) Becc. is popularly known as; licuri, ouricuri, aricuri, etc., this palm is commonly found in dry and arid regions of the Caatinga, occupying the eastern and central part of Bahia to the south of Pernambuco, northern Minas Gerais and areas of Alagoas and Sergipe (CREPALDI et al., 2001; BELVISO et al., 2013). Licuri has great social and economic importance for the region since it involves local community participation in fruit harvesting and seed processing, which can be consumed raw, cooked or toasted or used to obtain oil that is consumed by the local cookery and others (BELVISO et al., 2013). The leaves are used to feed cattle, birds and wild animals (DRUMOND, 2007). In addition, licuri seeds have a high nutritional value (49.2% lipids, 9.7% Carbohydrates, 11.5% proteins, 2.6x10⁶ J / 100g) (CREPALDI et al., 2001; BELVISO et al., 2013).

However, few scientific reports had been published on the pharmacological potential of *S. coronata*, some of which have shown that extracts or fractions of this plant have anti-*Leishmania amazonensis* properties (RODRIGUES et al., 2011), antimicrobial activity

(HUGHES et al., 2013; SILVA BESSA et al., 2016) and antioxidants (BELVISO et al., 2013). Specifically, *S. coronata* dried fruits oils were evaluated for use as biodiesel (DE LA et al., 2010) and topical emulsion (LEAL et al., 2013) presenting good results in both.

Microemulsions (MEs) are homogeneous systems, can be viscous and are thermodynamically stable. These systems have dimensions varying between the micrometric to nanometric scale, optical transparency, and ability to deliver hydrophilic and lipophilic drugs (ABOOFAZELI et al., 1994; CONSTANTINIDES et al., 1994; CONSTANTINIDES and YIV, 1995; VAN DEN BOGAARD and STOBBERINGH, 2000), has being considered ideal liquid systems for the release of drugs (HO et al., 1996). They are formed basically by oil, water, surfactant and cosurfactants, and such proportions can be defined by the construction of a phase diagram. The preparation of the diagram will define the microemulsions which can be prepared with the previously chosen active compounds. MEs may be administered by various routes where the most common are oral, parenteral, topical, ocular and nasal routes (EL MAGHRABY, 2008; BASTO et al., 2016).

The objective of this study was to determine the pseudoternary phase diagram of the licuri oil to obtain the best formulation of the microemulsion, to evaluate its stability, characterization, to examine toxic activity and acute lethal effect against *C. elegans* and to test its antibacterial potential on resistant *S. mutans* for future formulation of an oral septic product.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Plant material

The fixed oil from licuri was commercialized by Licuri Brasil (www.licuribrasil.com.br) located in Bahia, the characterization analysis of the fatty acids present in the oil was made by gas chromatography (GC and CG / MS) after de-esterification. The constituents were identified by comparison of their retention indices with those of the literature. The retention indices were determined in relation to a homologous series of n-alkanes (C8-C32) under the same operating conditions. Component relative percentages were calculated based on GC peak areas without using correction factors (AYAZ et al., 2017).

2.2 Pseudoternary phase diagram formulation

The diagram was obtained by visual inspection of the blends with the polyoxyethylene 20 mono-oleate desorbitan (Surfactant) and (Z)-sorbitan Mono-9-octadecanoate (Cotensoactive) in the ratio 40% and 60% respectively and, to this mixture, was (oil phase) was added in the ratios of 1: 9, 2: 8, 3: 7, 4: 6, 5: 5, 6: 4, 7: 3, 8: 2 and 9: 1, simultaneously.

The titrations were made with distilled water, using an automatic pipette adjusted to the appropriate concentrations, adding dropwise at room temperature. During titration the mixture was homogenized by ultra-turrax stirrer for 1 min, and then the mixture was potentiated at the ultrasonicator for 3 min, the procedure was repeated and after 5 min rest the visual appearance changes were observed. (DJORDJEVIC et al., 2004; SINTOV and SHAPIRO, 2004; KE et al., 2005; FORMARIZ et al., 2005, 2006, 2007).

2.2.1 Formulation selection (Microemulsion)

After constructing the diagram, the liquid microemulsion formulations were obtained in distinct regions, from these regions a average was performed and then selected a formulation (liquid microemulsion/gel) from which it was prepared by simple solubilization of the components under stirring in the homogenizer after heating (OKUMA et al., 2015). The formulations were prepared 48 hours before the characterization tests for thermodynamic stabilization of the system at room temperature (SILVA et al., 2009b).

2.3 Preliminary stability control

2.3.1 Macroscopic aspects

The macroscopic aspect of the microemulsion was measured for probable changes in overall appearance, including color, consistency, presence or absence of visible indicators of instability, such as phase separation, sedimentation, and mass formation (BRASIL, 2004).

2.3.2 Measurement of pH

The pH of the microemulsion was measured using a digital pH meter equipped with a glass electrode and temperature sensor, previously calibrated at pH 4.0 and 7.0 at $\pm 25^\circ\text{C}$.

2.3.2 Phases

The microemulsion (2 mL) was dissolved with equal amount of distilled water in a test tube. In cases where the water was incorporated into the microemulsion, the microemulsion was considered to be of the O/W type. Likewise, 2 mL of the microemulsion was dissolved in the same volume of oil, and if the incorporation was good, it was classified as type W/O (SILVA, 1997).

2.3.4. Viscosity

For all samples the parallel plate measuring geometry of 50 millimeters in diameter was used. All tests were done at 25 °C. With this type of test it is possible to verify the behavior of the viscosity of the sample according to the variation of the shear rate. The assay was performed considering a rate variation of 10 to 100s⁻¹. It was used the rheometer MCR 72 with PP50.

2.3.5 Centrifugation

Sedimentation was performed with 5mL of the microemulsion at 3500 rpm for 20 min using a Centrifio centrifuge.

2.3.6 Evaluation of additional macroscopic characteristics

For the evaluation of temperature stability 24h after the preparation, 5ml of each microemulsion were placed in glass tubes and incubated at high temperatures (45 ± 2 °C) and low (5 ± 2 °C).

2.4 Toxicity activity and acute lethal effect on *C. elegans*

Three different concentrations were used plus control of the microemulsion in triplicate, from which it was diluted in autoclaved water reaching concentrations of 27%, 18% and 9% of the licuri oil. The experiment was carried out in 24-well plates, for each replicate with 10 adult nematodes per well the different concentrations of ME were exposed in a methodology adapted from MONTEIRO et al. (2014). The solutions present in the wells of the plates were poured in a 38-mm sieve and washed 3 to 5 times, to achieve adequate visualization, counting and definition of lethality of the nematodes under stereomicroscope. Mortality was evaluated every 24 hours destructively for three subsequent days, dead nematodes were considered only as organisms without pharyngeal pulsation and inability to respond to the touch of a tungsten needle. Data were transformed to percent mortality, then a mortality and mortality curve plot for 72 hours of exposure were calculated using a sigmoidal regression model using sigmaplot program 12.5.

2.5 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) on resistant *S. mutans*

The MIC was determined by the microdilution method (FERRARO, 2008). The microdilution was done in triplicate. A solution containing microemulsion and Mueller Hinton Broth medium (MHB) were added 100 µl (approximately 1.5×10^9 CFU / ml) of bacterial suspension. The samples were incubated for 24h at 37 °C. For read the test was used

7-hydroxy-3H-phenoxazine-3-on-10-oxide or resazurin (0.01%) that it's a color-oxide-reducing indicator compound which in the presence of viable cells has a pink coloration. The lowest concentration at which no color change occurred is considered as MIC.

3. RESULTS

3.1 Fatty acid composition (GC and GC/MS analyses)

The composition of the fatty acids presents in the licuri fixed oil are listed in table I, the distribution of the fatty acids was defined as: 71.6% saturated, 24.6% monounsaturated and 3.8% polyunsaturated; in a total of 19 fatty acids detected. Traces of some fatty acids with odd-numbered carbon atoms have been detected, which are not usually reported in oils in the literature, such as: *Heptanoic acid*, *Nonanoic acid*, *Undecanoic acid*, *Tridecanoic acid*, *Pentadecanoic acid*, *Heptadecanoic acid*. The major saturated acid was C₁₂, lauric acid (42.5%), then C₁₄ (10.8%), C₁₆ (8.34%), C₈ (7.53%), C₁₀ (5.45%) and C₁₈ (4.34%) were also present in considerable concentrations.

Table 1. Fatty acid composition (Mean $\pm$ SD) of *S. coronata* oils.

Fatty Acid		% of the total fatty acids
Saturated fatty acids		74.68
Caproic acid	C6:0	Tr
Enanthic acid	C7:0	Tr
Caprylic acid	C8:0	6.53 $\pm$ 0.06
Pelargonic acid	C9:0	Tr
Capric acid	C10:0	4.45 $\pm$ 0.10
Undecanoic acid	C11:0	Tr
Lauric acid	C12:0	41.5 $\pm$ 0.20
Tridecanoic acid	C13:0	Tr
Myristic acid	C14:0	9.8 $\pm$ 0.05
Pentadecanoic acid	C15:0	Tr
Palmitic acid	C16:0	7.34 $\pm$ 0.10
Margaric acid	C17:0	Tr
Stearic acid	C18:0	4.3 $\pm$ 0.10
Eicosanoic acid	C20:0	0.31 $\pm$ 0.002
Behenic acid	C22:0	0.35 $\pm$ 0.03
Lignoceric acid	C24:0	0.10 $\pm$ 0.04
Monounsaturated fatty acids		22.54
9-octadecenoic acid	C18:1	22.39 $\pm$ 0.45
11-eicosenoic acid	C20:1	0.15 $\pm$ 0.02
Polyunsaturated fatty acids		2.78
9,12-octadecadienoic acid	C18:2	2.78 $\pm$ 0.10

3.2 Microemulsion phase diagram

For the characterization of the ME regions the construction of the phase diagram is of fundamental importance since its interpretation will describe the present structures and in what proportions they are presented with greater stability, being able to with that be determined the region by which the viscosity is more appropriate for the active principle to be incorporated (SILVA et al., 2009a). The diagram was constructed in three dimensions from data obtained by titration and by the preparation of a large number of samples in different proportions.

After the construction of the diagram, liquid and gel microemulsion formulations were obtained in close regions, in the proportions of 27% to 54% of licuri oil, presented as a homogeneous system, without phase separation, viscous yellowish and translucent, with pH between 6.5 and 7.0 and stability after 24h, 15 days and 30 days (Figure 1). According to the classification of Winsor (1948), the Winsor IV type system occurs when there is no excess of aqueous or oily phase, forming a homogenous and monophasic system (WINSOR, 1948).

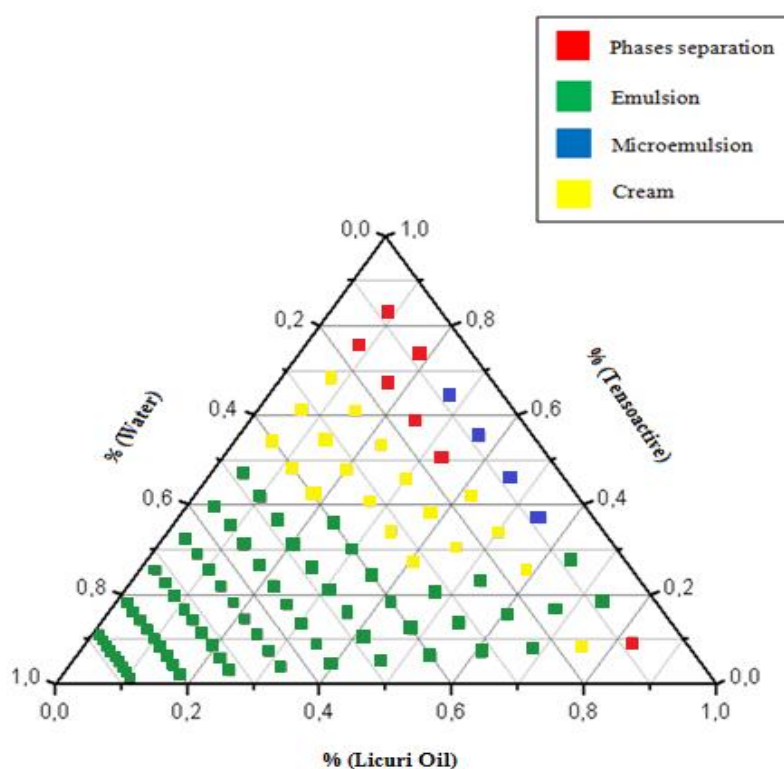


Figure 1. Pseudoternary phase diagram for the Licuri oil, tween 80, span 80 and water system.

Table 2 represents the characterization of the stable microemulsions formulated in the pseudoternary phase diagram, of which without presenting in a small portion of the triangle,

the licuri oil presents great emulsifying capacity, thus accentuating the formation of emulsions and/or creams. The microemulsion systems plotted in the diagram, were stable maintained as good viscosity systems, with low variations during the period evaluated.

Table 2. Caracterization of Microemulsion (24h, 15 days e 30 days).

%			24 hours				15 days					30 days					
O/T	S80/T80	MA	pH	°C	Ph	MA	pH	V	°C	C	Ph	MA	pH	V	°C	C	Ph
27/63	18/44	T/v	6,5	+	W/O	T/v	6,5	33	+	+	W/O	T/v	6,5	33,5	+	+	W/O
36/54	16/37	T/v	6,9	+	W/O	T/v	6,7	34	+	+	W/O	T/v	6,5	34,7	+	+	W/O
45/45	13/31	T/v	6,6	+	W/O	T/v	6,5	41	+	+	W/O	T/v	6,5	41,4	+	+	W/O
54/36	10/25	T/v	7,0	+	W/O	T/v	6,5	43	+	-	W/O	T/v	6,5	43,5	+	-	W/O

MA = macroscopic aspects; A = water, (+) = stable, (-) = Unstable, T = translucent, v = viscous, L = H = lipophilic / hydrophilic

3.3 Toxic activity and acute lethal effect on *C. elegans*

At the beginning of the experiment the effects of liquor oil on the nematodes were almost imperceptible even at the highest concentrations of 27% of ME (Figure 2A). In this way, the effect of the oil only occurred in an active way when the nematode fed and ingested, increasing its effect after 48 h (Figure 2B) and after 72 h (Figure 2C).

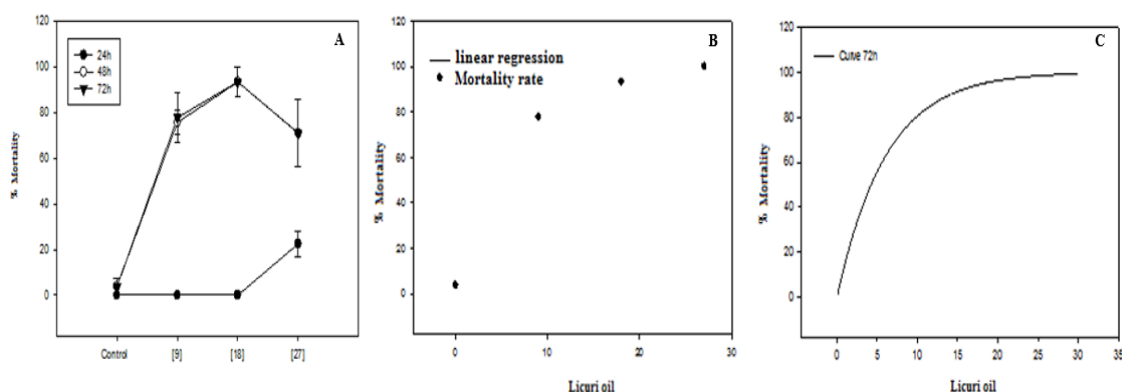


Figure 2. Effect of toxicity on *C. elegans* (A), linear regression (B) and acute lethal effect (C)

3.4 *Streptococcus mutans* resistant activity (MIC)

The microemulsion formulated with the licuri oil showed strong activity against newly isolated strains of resistant *S. mutans*. CIM values against *S. mutans* ranged from 15 μ L/mL to 10 μ L/mL.

4. DISCUSSION

In the present study, we examined some toxicological and pharmacological parameters of dried fruit oil extract of licuri (*Syagrus coronata*) and we formulated a pseudoternary phases diagram to produce in a future an oral septic product. We observed that the majority compound fatty acid was the Lauric acid, then was detected in almond oils from three species of the same Licuri family, two of the same genus (COIMBRA and JORGE, 2011; SILVA BESSA et al., 2016), this same fatty acid is a striking feature in species of the palm family, such as the seeds of palm and coconut, and therefore studies refer to the licuri oil the same benefits that coconut oil promotes (LAURELES et al., 2002; BORA and MOREIRA, 2003). In this way, most oils rich in lauric acid have antibacterial activity, inhibit protozoa, reduce methane production and ammonia concentration (YABUUCHI et al., 2006).

About the results showed in chemistry profile plus the phases diagram we can observe that formulations with 10%, 15% and 20% licuri oil presented as liquid and opaque solutions with white coloration, pH between 5.5 and 6.5, and as phase separation after 24h, where the oil phase deposited, thus, it was determined that concentrations with 5% of surfactants made the system unstable, previous studies with the same oil for formulation of emulsions with humectants purpose, presented similar results, indicating that the surfactants at these concentrations are insufficient to maintain the stability of the system (LEAL et al., 2013).

Concentrations of 10%, 15% and 20% of surfactants liquid presented opaque systems with white color, but with great stability after 24h, 15 days and 30 days, presented good results for emulsified systems, with low viscosity, pH between 5 and 6, similar results were showed at these same concentrations (LEAL et al., 2013), where the stability of the system was maintained in the long term, around 180 days. The viscosity evaluation assists in determining whether or not the evaluated product has adequate consistency or flow, thereby helping to predict the long-term behavior of the product (BRASIL, 2004).

During the evaluated period the MEs did not present significant changes in pH, remaining slightly acidic, with values between 6.5 and 7.0. PH is one of the most important gradients for a system as it will ensure the stability of the ingredients of a formulation promoting effectiveness and safety. Higher stabilities are achieved with minimal pH variations (FRANGE and GARCIA, 2010).

There are no studies reporting *S. coronata* dried fruit oil toxicity therefore there are a number of experimental attributes that make *C. elegans* a very successful animal model with a growing number of publications in developmental biology, genetics, aging, toxicity and ecotoxicology (DIOGO and MOTA, 2001) its short life cycle of approximately 21 days,

allowing the accomplishment of studies in a time space practically impracticable in classic mammalian models; many possibilities related to genetics, since about 60% of the genes of *C. elegans* have homologues in mammals (KALETTA and HENGARTER, 2006).

Toxicity tests with nematodes are a promising way to identify the pharmacological effects of medicinal plants (AN and BLACKWELL, 2003) from which it is assessed through behavioral responses to exposure. In addition, sublethal parameters help assess the pollutant effects of exposed populations by helping to unravel their mechanisms and effects (BOYD et al., 2003; HÖSS and WILLIAM, 2009; WEBER and TRAUNSPURGER, 2012).

Although *C. elegans* is a fast metabolic nematode with high reproductive capacity and short life cycle (BYERLY et al., 1976), it was noted that its semipermeable cuticle served as a barrier (CHISHOLM e XU, 2012) and did not absorb the licuri oil in the initial 24 hours of the experiment, causing this time to have an almost imperceptible effect even at the highest concentration (27% of the oil) tested.

Thus, the effect of licuri oil occurred actively during the nematode feeding attempt (AVERY and SHTONDA, 2003) and with the ingestion of the oil, its effect increased after the second 48h count (graph 1). The lethal effect of the licuri oil became evident for adult *C. elegans* obtaining a LC50 of 6.41% of the licuri oil for 72h of experiment (graph 2), while maintaining the inhibitory expectations studies showed that when evaluated the effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* (PESSOA et al., 2002) the oil and its major compound, eugenol, showed similar effect to the licuri oil.

Studies with the oil extracted from the fruit of *Pterodon emarginatus* front *C. elegans* that were exposed to different concentrations of the oil for 30 min and evaluated the extreme parameters of stress, antioxidant activity, survival tests, life time and lipid accumulation. Fruit oil *Pterodon emarginatus* (0.2, 0.5, 1.0 mg / mL) increased the longevity of the nematodes without affecting their reproduction, under the conditions of oxidative stress the oil provided protection against pro-oxidants, decreased production of the reactive oxygen and inducing the increase of levels of antioxidant enzymes, in addition, observed that the oil reduced the accumulation of lipids and triglycerides. Thus, low concentrations and exposed for short intervals of time of *Pterodon emarginatus* oil exhibited an antioxidant capacity, promoting increased longevity without affecting the reproductive capacity of *C. elegans* (DAL FORNO et al., 2016).

S. mutans is routinely associated with as a cause of dental caries (CARLSSON, 1968). Studies have been able to identify and prove that *Streptococcus* transmitted dental infections in rodent models (FITZGERALD, 1968) and dental degeneration (LOESCHE et al., 1984;

LOESCHE, 1986). The microemulsion formulated with the licuri oil showed strong activity against newly isolated strains of resistant *S. mutans*. CIM values against *S. mutans* ranged from 15 μ L/mL to 10 μ L/mL. Studies with the antimicrobial potential of pure licuri oil were observed against standard strains and freshly isolated strains of *S. aureus*, which the MIC values of pure and fixed oil varied from 2 μ L/mL to 8 μ L/mL (SILVA BESSA et al., 2016). The analysis of the data indicates that the fatty acids of the liqueur oil present in ME presented significant results when compared with the control and with previous studies of the pure oil. This potential is due to the presence of the bioactive constituents, such as compounds of saturated fatty acids and monounsaturated fatty acids, of which they were responsible for the antimicrobial activity.

Fixed and essential oils from medicinal plants are involved in many important actions related to plant survival, playing prominent role in their defense against microorganisms. The use of fixed and essential oils as antimicrobials have two main characteristics: 1) their natural origin and greater safety for users and the environment; 2) there is a low risk of increased microbial resistance, since its action is due to the mixture of several compounds that, apparently, presents different antimicrobial action, making it more difficult for microorganisms to adapt (DAFERERA et al., 2003).

Previous studies have suggested that fatty acids from fixed oils could penetrate the cell in the non-associated form, solubilizing within the cell and causing the dispersion of the transmembrane H⁺ gradient. The hydrophobic groups of fatty acids have the greatest influence on the antibacterial activity (BRANEN et al., 1980; ALTIERI et al., 2005) and the increase in the chain length of fatty acids increase their hydrophobicity in this way, reducing their solubility in aqueous systems.

Thus, hydrophobic groups may be prevented from reaching a concentration sufficient to interact with hydrophobic or lipid proteins on the surface of bacterial cells (WANG e JOHNSON, 1992) In addition, the antimicrobial activity of monoglycerides can be proposed by acting as non-ionic surfactants that penetrate and enter the bacterial plasma membrane, altering membrane permeability (BERGSSON et al., 1998, ALTIERI et al., 2005).

Conclusion

Through pseudoternary phase diagram microemulsion and emulsion formulations became better visualized as the concentrations were minutely determined to achieve the desired target. A priori, the microemulsion was formulated for the development of a future mouthwash and through the tests carried out one can observe what would be the best

formulations and concentrations of the oil to achieve this purpose. Licuri oil proved to be a potential natural product for the development of drugs and / or cosmetics due to its characteristics and activities, presenting great potential for its incorporation in the scientific / technological and industrial market.

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could compromise the results obtained in this work.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Foundation for Support to Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) for the financial support granted in the form of a scholarship to the first author. The authors also thank the company Anton Paar for the analyzes carried out.

5. REFERENCES

- ABOOFAZELI, R., LAWRENCE, C.B., WICKS, S.R., LAWRENCE, M.J. Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. III. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-isopropyl myristate and either an alkanolic acid, amine, alkanediol, polyethylene glycol alkyl ether or alcohol as cosurfactant. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 111, n. 1, p. 63-72, 1994.
- ALTIERI, C., CARDILLO, D., SINIGAGLIA, M. Effect of low doses of monolaurin on growth of common foodborne microbial strains. **Advances in Food Sciences**, v. 27, n. 3, p. 135-141, 2005.
- AN, J.H., BLACKWELL, T.K. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. **Genes & development**, v. 17, n. 15, p. 1882-1893, 2003.
- AVERY, L., SHTONDA, B.B. Food transport in the *C. elegans* pharynx. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 14, p. 2441-2457, 2003.
- AYAZ, M., JUNAID, M., ULLAH, F., SADIQ, A., SHAHID, M., AHMAD, W. & SYED, N. I. H. GC-MS Analysis and Gastroprotective Evaluations of Crude Extracts, Isolated Saponins, and Essential Oil from *Polygonum hydropiper* L. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, p. 58, 2017.
- BASTO, S.R.L., FERREIRA-SILVA, J.C., SILVA, F.L.A., ALEIXO, G.A.S., STAMFORD, T.C.M., SILVA, M.V. & CORREIA, M.T.S. Emulsão e microemulsão: novos sistemas de liberação controlada. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 10, n. 1-4, p. 25-33, 2016.
- BELVISO, S., GHIRARDELLO, D., GIORDANO, M., RIBEIRO, G.S., DE SOUZA ALVES, J., PARODI, S., ZEPPA, G. Phenolic composition, antioxidant capacity and volatile compounds of licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari) fruits as affected by the traditional roasting process. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 39-45, 2013.

BERGSSON, G., ARNFINNSSON, J., KARLSSON, S.M., STEINGRÍMSSON, Ó., THORMAR, H. *In vitro* inactivation of *Chlamydia trachomatis* by fatty acids and monoglycerides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 9, p. 2290-2294, 1998.

BORA, P.S., MOREIRA, R.V. Catolé palm (*Syagrus oleracea* Mart) fruits: fatty and amino acids composition. **Grasas y Aceites**, v. 54, n. 2, p. 145-150, 2003.

BOYD, W.A., COLE, R.D., ANDERSON, G.L., WILLIAMS, P.L. The effects of metals and food availability on the behavior of *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 12, p. 3049-3055, 2003.

BRANEN, A.L., DAVIDSON, P.M., KATZ, B. Antimicrobial properties of phenolic antioxidants and lipids. **Food Technology (USA)**, v. 34, n. 5, p. 42-53, 1980.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 1.ed. Brasília: Anvisa, 2004, 34-35p.

BYERLY, L., CASSADA, R.C., RUSSELL, R.L. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild-type growth and reproduction. **Developmental Biology**, v. 51, n. 1, p. 23-33, 1976.

CARLSSON, J. A numerical taxonomic study of human oral streptococci. **Odontologisk Revy**, v. 19, n. 2, p. 137, 1968.

CHISHOLM, A.D., XU, S. The *Caenorhabditis elegans* epidermis as a model skin. II: differentiation and physiological roles. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 1, n. 6, p. 879-902, 2012.

COIMBRA, M.C., JORGE, N. Fatty acids and bioactive compounds of the pulps and kernels of Brazilian palm species, guariroba (*Syagrus oleraces*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 679-684, 2012.

CONSTANTINIDES, P.P., SCALART, J.P., LANCASTER, C., MARCELLO, J., MARKS, G., ELLENS, H., SMITH, P.L. Formulation and intestinal absorption enhancement evaluation of water-in-oil microemulsions incorporating medium-chain glycerides. **Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 10, p. 1385-1390, 1994.

CONSTANTINIDES, P.P., YIV, S.H. Particle size determination of phase-inverted water-in-oil microemulsions under different dilution and storage conditions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 115, n. 2, p. 225-234, 1995.

CREPALDI, I.C., ALMEIDA-MURADIAN, L.D., RIOS, M.D.G., PENTEADO, M.V.C., SALATINO, A. Composição nutricional do fruto de licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 2, p. 155-159, 2001.

DAFERERA, D.J., ZIOGAS, B.N., POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, n. 1, p. 39-44, 2003.

DAL FORNO, A.H., CA`MARA, D., PARISE, B., RODRIGUES, C.F., SOARES, J.J., WAGNER, R., FARIAS, F.M. Antioxidant and lipid lowering effects of dried fruits oil

extract of *Pterodon emarginatus* in *Caenorhabditis elegans*. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016. In Press.

DE LA, K.T.D.S., MENEGHETTI, S.M.P., DE LA SALLES, W.F., MENEGHETTI, M.R., DOS SANTOS, I.C.F., DA SILVA, J.P.V., SOLETTI, J.I. Characterization of *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. oil and properties of methyl esters for use as biodiesel. **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 518-521, 2010.

DIOGO, A., MOTA, M. *Caenorhabditis elegans*: Modelo Biológico para o século XXI. **Laboratório de Nematologia/ICAM. Universidade de Évora**. Évora, 2001.

DJORDJEVIC, L., PRIMORAC, M., STUPAR, M., KRAJISNIK, D. Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 271, n. 1, p. 11-19, 2004.

EL MAGHRABY, G.M. Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: effects of cosurfactants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1, p. 285-292, 2008.

FERRARO, M.J. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. NCCLS, 2001.

FERREIRA-SILVA, J.C., BASTO, S.R.L., TENÓRIO FILHO, F., MOURA, M.T., SILVA FILHO, M.L., OLIVEIRA, M.A.L. Reproductive performance of postpartum ewes treated with insulin or progesterone hormones in association with ram effect. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 4, p. 610-616, 2017.

FITZGERALD, R.J. Dental caries research in gnotobiotic animals. **Caries Research**, v. 2, n. 2, p. 139-146, 1968.

FORMARIZ, T.P., CHIAVACCI, L.A., SARMENTO, V.H.V., SANTILLI, C.V., DO EGITO, E.T., OLIVEIRA, A.G.D. Relationship between structural features and in vitro release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 60, n. 1, p. 28-35, 2007.

FORMARIZ, T.P., SARMENTO, V.H.V., SILVA-JUNIOR, A.A., SCARPA, M.V., SANTILLI, C.V., OLIVEIRA, A.G. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 51, n. 1, p. 54-61, 2006.

FORMARIZ, T.P., URBAN, M.C.C., SILVA JUNIOR, A.A.D., GREMIÃO, M.P.D., OLIVEIRA, A.G. D. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005. FRANGE, R.C.C., GARCIA, M.T.J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 263-271, 2010.

HO, H.O., HSIAO, C.C., SHEU, M.T. Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 2, p. 138-143, 1996.

HÖSS, S., WILLIAMS, P.L. Ecotoxicity testing with nematodes. **Nematodes as Environmental Indicators**. CAB International, Cambridge, MA, USA, p. 208-224, 2009.

HUGHES, A.F.D.S., LIMA, F.G.D., LUCCHESI, A.M., GÓES NETO, A., UETANABARO, A.P.T. Antimicrobial activity of *Syagrus coronata* (Martius) Beccari. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 2, p. 269-274, 2013.

KALETTA, T., HENGARTNER, M.O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 5, p. 387-399, 2006.

KE, W.T., LIN, S.Y., HO, H.O., SHEU, M.T. Physical characterizations of microemulsion systems using tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) as a surfactant for the oral delivery of protein drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 102, n. 2, p. 489-507, 2005.

LAURELES, L.R., RODRIGUEZ, F.M., REAÑO, C.E., SANTOS, G.A., LAURENA, A.C., MENDOZA, E.M.T. Variability in fatty acid and triacylglycerol composition of the oil of coconut (*Cocos nucifera* L.) hybrids and their parentals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1581-1586, 2002.

LEAL, L.B., SOUSA, G.D., SEIXAS, K.B., SOUZA, P.H.N.D., SANTANA, D.P.D. Determination of the critical hydrophile-lipophile balance of licuri oil from *Syagrus coronata*: application for topical emulsions and evaluation of its hydrating function. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 1, p. 167-173, 2013.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 4, p. 353, 1986.

LOESCHE, W. J., GROSSMAN, N. S., EARNEST, R., & CORPRON, R. The effect of chewing xylitol gum on the plaque and saliva levels of *Streptococcus mutans*. **The Journal of the American Dental Association**, v. 108, n. 4, p. 587-592, 1984.

MARTIN, G.B., KADOKAWA, H. "Clean, green and ethical" animal production. case study: reproductive efficiency in small ruminants. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 1, p. 145-152, 2006.

MONTEIRO, L., BRINKE, M., DOS SANTOS, G., TRAUNSPURGER, W., MOENS, T. Effects of heavy metals on free-living nematodes: a multifaceted approach using growth, reproduction and behavioural assays. **European Journal of Soil Biology**, v. 62, p. 1-7, 2014.

OKUMA, C.H., ANDRADE, T.A.M.D., CAETANO, G.F., FINCI, L.I., MACIEL, N.R., TOPAN, J. F., SPADARO, A.C.C. Development of lamellar gel phase emulsion containing marigold oil (*Calendula officinalis*) as a potential modern wound dressing. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, p. 62-72, 2015.

PESSOA, L.M., MORAIS, S.M., BEVILAQUA, C.M.L., LUCIANO, J.H.S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 109, n. 1, p. 59-63, 2002.

RODRIGUES, A.G., SANTOS, M.D., AMARAL, A.C.F. **Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de assistência farmacêutica. Fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos.** Brasília:(DF): MS, p. 9-28, 2006.

RODRIGUES, I.A., ALVIANO, D.S., GOMES, M.T., SILVA, D.O., ANTONIASSI, R., SILVA, A.J.R., MARIA DO SOCORRO, S.R. In vitro anti-*Leishmania amazonensis* activity of the polymeric procyanidin-rich aqueous extract from *Syagrus coronata*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 16, p. 3781-3790, 2011.

SANTOS, A.B.N., ARAÚJO, M.P., SOUSA, R.S., LEMOS, J.R. Known medicinal plants found in the urban Cajueiro da Praia urban area, Piauí state, Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 2, p. 442-450, 2016.

SILVA BESSA, C.M.A., NASCIMENTO, R.S., ALVES, R.C.C., ANSELMO, J.E.M., SILVA, A.P.S. A., SILVA, A.G., SANTOS CORREIA, M.T. 2016. *Syagrus coronata* seed oils have antimicrobial action against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 23, p. 310-317, 2016.

SILVA, J.A., BEDOR, D.C., DAMASCENO, B.P., OLIVEIRA, A.G., EGITO, E.S.T., SANTANA, D.P. Physicochemical characterization and development of a microemulsion system for transdermal use. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2009a.

SILVA, J.A., DE LIMA DAMASCENO, B.P.G., DA COSTA BORBA, V.F., DO EGITO, E.S.T., DE SANTANA, D.P. Uso de diagramas de fase pseudoternários como ferramenta de obtenção de nanoemulsões transdérmicas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 3, p. 245-249, 2009.

SILVA, M.V. **Determinação do EHL crítico de óleo de babaçu, avaliação da função hidratante e aplicação em emulsões tópicas como novo adjuvante lipofílico.** Recife, 88 p. [Dissertation of Master degree. Faculty of Pharmacy. Federal University of Pernambuco], 1997.

SINTOV, A.C., SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 95, n. 2, p. 173-183, 2004.

VAN DEN BOGAARD, A.E., STOBBERINGH, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, n. 4, p. 327-335, 2000.

WANG, L.L., JOHNSON, E.A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 624-629, 1992.
WEBER, S., TRAUNSPURGER, W. Food choice of *Panagrolaimus cfthienemanni* and *Poikilolaimus* spec. in dependence of food source and food density. **Nematology**, v. 15, p. 291-301, 2012.

WINSOR, P.A. Hydrotropy, solubilisation and related emulsification processes. **Transactions of the Faraday Society**, v. 44, p. 376-398, 1948.

YABUUCHI, Y., MATSUSHITA, Y., OTSUKA, H., FUKAMACHI, K., KOBAYASHI, Y.
Effects of supplemental lauric acid-rich oils in high-grain diet on in vitro rumen fermentation.
Animal Science Journal, v. 77, n. 3, p. 300-307, 2006.

3.3 ARTIGO 3 (Submetido)

Natural Product Reports (ISSN: 0265-0568)

Mouthwash with licuri fixed oil (*Syagrus coronata*): characterization, checkerboard study with essential oil of mint, antibacterial activity, nematocide and HET-CAM

Enxaguatório bucal com óleo fixo licuri (*Syagrus coronata*): caracterização, estudo checkerboard com óleo essencial de hortelã, atividade antibacteriana, nematocida e HET-CAM

Sarah Romini de Lima **Basto**¹, Fernanda Luizy Aguiar da **Silva**¹, José Carlos Ferreira da **Silva**², Camila Alexandre de **Luna**³, Giovanni Amadeu Paiva dos **Santos**³, Horacina Maria Cavalcante de **Andrade**⁴, Thayza Christina Montenegro **Stamford**⁵, Márcia Vanusa da **Silva**⁵, Maria Tereza dos Santos **Correia**⁵

¹Center of Bioscience, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil.

²Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, Brazil.

³Departamento de Zoologia, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil.

⁴Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil.

⁵Department of tropical Medicine, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil.

*Corresponding author: biologist.sarah@gmail.com

ABSTRACT

Oral mouthwashes are important resources in oral health maintenance, since it is able to provide the limitations of traditional mechanical hygiene because it reaches greater access to the bacteria of the dental biofilm. A great advantage of the use of medicinal plant oils as emulsions in products is the potentiation of a range of biological and organoleptic properties which they can confer on the formulations, in addition, such formulations promote an optimization of the delivery of the drug at the site of action, improving its bioavailability, reducing toxicity, facilitating administration, reducing the number of interventions and favoring the efficiency of treatments. In this study, a mouthwash based on licuri was developed. It was synergistic with the essential oil of mint, used as a flavoring agent. It showed bactericidal activity below 20µg/mL for several bacteria that promote the genesis of oral biofilm as well as other oral conditions, low toxicity to *C. elegans* and as non-irritant by the coriolantoid membrane method, presenting with this great pharmacological potential, and its high importance at the scientific, technological and market level.

Keywords: *Syagrus coronata*, fatty acids, bactericidal activity, *C. elegans*, HET-CAM.

RESUMO

Os enxaguatórios bucais são recursos importantes na manutenção da saúde oral, uma vez que são capazes de suprir as limitações da higiene mecânica tradicional por obter maior acesso às bactérias do biofilme dental. Uma grande vantagem do uso de óleos vegetais medicinais como emulsões em produtos é a potencialização de uma gama de propriedades biológicas e organolépticas que podem conferir às formulações, além disso, tais formulações promovem uma otimização da entrega do medicamento no local de ação, melhorando sua biodisponibilidade, reduzindo a toxicidade, facilitando a administração, reduzindo o número de intervenções e favorecendo a eficiência dos tratamentos. Nesse estudo, foi desenvolvido um enxaguatório a base de óleo fixo de licuri, no qual apresentou sinérgismo com o óleo essencial de menta, usado como agente aromatizante. O enxaguatório evidenciou atividade bactericida abaixo de 20 µg / mL para várias bactérias que promovem a gênese do biofilme

oral, bem como outras afecções bucais, baixa toxicidade para *C. elegans* e como não irritante pelo método da HET-CAM. O enxaguatório apresentou ótimo potencial farmacológico e, consequentemente, grande importância a nível científico, tecnológico e social.

Palavras-chave: *Syagrus coronata*, ácidos graxos, atividade bactericida, *C. elegans*, HET-CAM.

1 INTRODUCTION

Licuri (*Syagrus coronata*) is one of the most well-known native palm trees in Brazil and has great potential as an oleaginous (LINS et al., 2002). Predominantly of dry and arid regions of the Caatinga, presents / displays high socioeconomic value for diverse communities of the northeast, where this species is harnessed in its totality, being considered like fundamental provider of subsidies for the subsistence of the population of that region (LEAL et al, 2005). The licurian oil is extracted from the almond present internally in the fruit of the licurizeiro, which is widely known for its nutritional value, where it contains nutrients such as copper, iron, manganese, zinc, calcium, magnesium and is rich in beta-carotene, already the almond contains iron, manganese and selenium (CREPALDI et al., 2001), These properties guarantee a good functioning of the nervous and immune system, prevention of osteoporosis and strengthening of bones, such as atherosclerosis, heart problems, rheumatoid arthritis, infections, hypoglycemia, inflammation, lupus, etc. (GELEIJNSE, 1994; HITOSHI et al., 1995; ANJO, 2004; KONOVAL et al., 2004; MORAES and COLLA, 2006). In addition to all these properties, the oil extracted from the licuri kernel can be used in the production of biodiesel, in the pharmaceutical industry and in the cosmetics industry. (LEAL et al., 2013).

The sucrose and glucose derived from the diet are the main energy sources for *S. mutans*, through their metabolism leads to the formation of acidic compounds that promote the reduction of pH in the biofilm (5,5), generating solubilization of hydroxyapatite, the main mineral constituent of dental enamel. This process causes the superficial demineralization of the tooth and bacterial spread on the damaged tissue, initiating the dental caries (LEITÃO et al., 2004).

The use of mouthwashes has become increasingly frequent as a particularly important resource for oral hygiene, mainly because it presents some advantages such as easy use, refreshment, palatability and access to bacteria even in areas of greater difficulty, thus integrating barriers to oral hygiene mechanics (ASADOORIAN, 2006). It is important to highlight the adjuvant benefits of mouthwashes, which are of great importance for children and the elderly, from whom, in general, they are less resourceful or unable to achieve adequate brushing.

Extracts and plant oils and their compounds isolated have shown antibacterial potential against several oral pathogens (AMBROSIO et al., 2004; PORTO et al., 2009). A study carried out with mouthwashes containing oils extracted from plants showed efficiency in inhibiting the production of volatile sulfides by oral bacteria, which are the substances responsible for halitosis (BRITTO et al., 2009).

Many essential and fixed oils share anti-inflammatory and antioxidant effects (FDA, 2003; MIGUEL, 2010), properties that may associate therapeutic value with formulations. Thus, the advantages of using these oils in oral health products are the range of biological and organoleptic properties which they can additionally grant to the formulations to the use of active ingredients of organic origin in emulsion and microemulsion formulations which may increase the efficiency of these products (BASTO et al., 2016).

In this way, this study aimed to formulate, develop and characterize a mouthwash containing liqueur fixed oil, to test microorganisms that cause caries and other oral conditions, besides evaluating behavior through the checkerboard method, to verify the behavior in association with the essential oil of mint, its cytotoxicity against *C. elegans* and the irritability index with the HET-CAM test.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Plant materials and chemicals

Fixed licuri oil and peppermint oil were marketed from Licuri Brasil located in Bahia and Ferquima located in Sao Paulo, respectively, characterization analyzes of the essential oil of peppermint and of the fatty acids present in the licuri oil were done by gas chromatography (GC and GC / MS analyzes).

2.2 Formulation

The formulation of the licuri-based mouthwash was done by visual inspection of the licuri oil, surfactant and water blends, then a pseudoternary phase diagram (BASTO et al., 2016) was developed after plotting the dots, we chose the best formulation that suited the standard blend for the development of a mouthwash.

2.3 Physical-chemical characterization of mouthwash

2.3.1 Microscopy of polarized light

The formulation was placed on covered glass sheet with cover slip and then observed under a polarized light microscope (Olympus BX-50). It was examined whether the sample would show transparency (possible microemulsion) or formation of apparently translucent regions (emulsion).

2.3.2 Droplet size

The droplet size of the formulation was determined with the aid of a Particle Analyzer model Litesizer TM 100 (Anton paar) at room temperature.

2.3.3 Zeta Potential

The zeta potential value was determined with the aid of a Litesizer TM 100 (Anton paar), in order to evaluate the stability of the proposed system through the conductivity of the system.

2.3.4 Rheology

In order to determine the rheological behavior of the mouthwash, a MCR 72 Rheometer with PP50 with temperature control P-PTD200/AIR (Anton Paar) was used, using a parallel plate measuring geometry of 50 millimeters in diameter. All tests were done at 25°C. With this type of test, it is possible to verify the behavior of the viscosity of the sample according to the variation of the shear rate. The assay was performed considering a rate variation of 10 to 100s⁻¹.

2.3.5 pH

The pH value of the microemulsion was determined by a pH meter (Digimed, model DMPH-2).

2.3.6 Centrifugation

The mouthwash was centrifuged after preparation at 956g for 30min at room temperature in order to determine its stability as a single phase isotropic system (Stability Guide of Cosmetic Products / ANVISA, 2004).

2.4 Checkerboard study

The checkerboard method was performed using 96-well microtiter plates (GUTIERREZ et al., 2008), to obtain the CIF index (Fractional Inhibitory Concentration). The microplate assay was organized as follows: Fixed licuri oil (OF) was diluted twice along the x-axis, while mint essential oil (OE) was diluted twice along the y-axis. The final volume in each well was 100 μ L, including 50 μ L of each OF dilution. Respectively, 100 μ L of medium containing 2×10^6 CFU/mL of the indicator strain was added to all wells. The plates were then incubated at 37°C for 18h. The CIF indexes were calculated as CIFA + CIFB, where CIFA and CIFB are the minimum concentrations that inhibited bacterial growth for OF and OE, correspondingly. Thus, the CIFs were calculated as follows: CIFA = (CIMA/CIMA combination alone) and CIFB = (CIMB / CIMB combination alone). The results were interpreted as synergy (CIF < 0.5), additive ($0.5 \leq \text{CIF} \leq 1$), indifference ($1 < \text{CIF} \leq 4$) or antagonism (CIF > 4), all experiments were done in triplicate.

2.5 Anti-bacterial activity of the licuri mouthwash (MIC)

The minimum inhibitory concentration was determined by the microdilution method (FERRARO, 2008). The microdilution was done in triplicate. In a solution containing microemulsion and Mueller Hinton Broth medium (MHB) were added 100 μ L (approximately 1.5×10^6 CFU ml) of bacterial suspension. Samples were incubated for 24h at 37°C. For the test reading 7-hydroxy-3H-phenoxazine-3-on-10-oxide or resazurin (0.01%) was used, is a blue oxide-reducing indicator compound which in the presence of viable cells shows color pinkish. The lowest concentration at which no color change occurred is considered as MIC.

2.6 Nematicidal activity (acute test) with *C. elegans* front bucal mouthwash and commercial mouthwash

In order to perform the experiments, two different concentrations of 1% and 5% diluted in autoclaved drinking water of the licuri and industrial rinse (Cepacol) plus the positive control were used in a methodology adapted from DAL FORNO et al. (2016) made in triplicate. The experiment was performed in 24 well titration plates, for each replicate with 100 adult nematodes/well the different concentrations of the nasal spray and the positive control were exposed. Mortality was assessed every 24 hours for three subsequent days. Data were transformed to percent mortality.

2.7 Irritability test by the chicken egg chorioallantoic membrane method (HET-CAM)

The HET-CAM test (Figure 1) was performed according to the methodology described by STEILING et al. (1999), and was done on the tenth day of incubation of the fertilized eggs. Initially, the reservoir above the egg's airspace was removed. The egg's chorioallantoic membrane was exposed and moistened with 0.9% physiological saline solution. A 200µL aliquot of the rinse was applied to the chorioallantoic membrane, then the membrane was observed for 5 minutes in order to identify signs of hyperemia, hemorrhage and coagulation. The time (in seconds) that each of the initiated signals is applied in the formula (Figure 2) (VARGAS et al., 2007). The negative control used was sodium lauryl sulfate 1%. Through this formula (Figure 2) the observed irritation potential was quantified. The irritation index is determined according to the following values: 0.0-0.9, without irritation; 4.9, slight irritation; 5.0-8.9, moderate irritation; and 9.0-21.0, severe irritation (STEILING et al., 1999), all assays were done in triplicate.

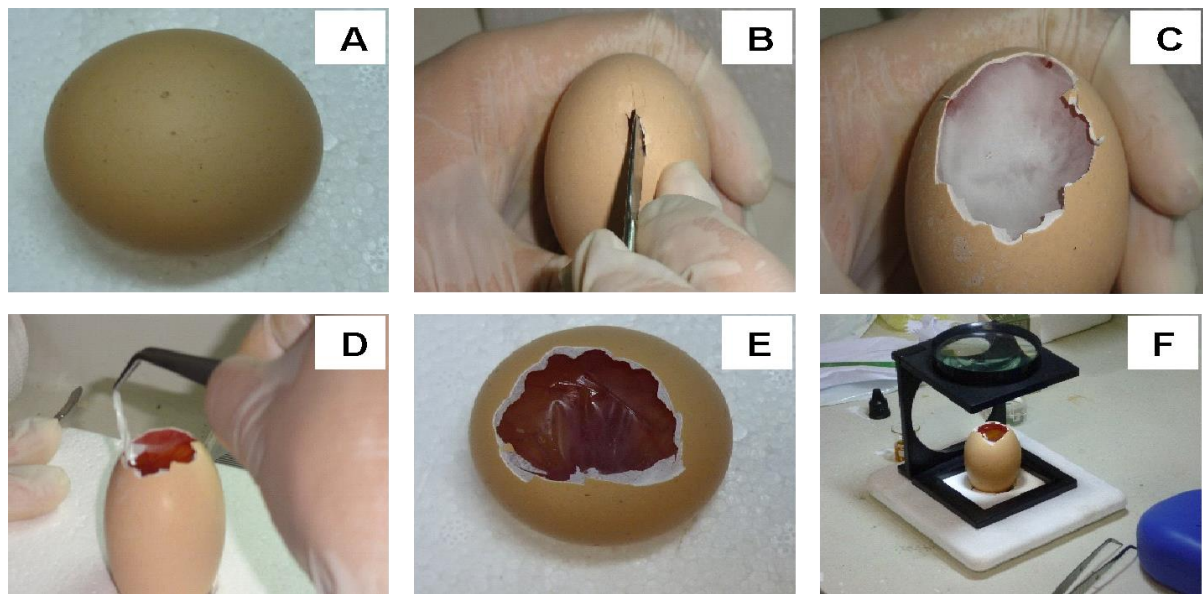


Figure 1: Experimental steps of the HET-CAM test: (A) Egg on the 10th day of incubation after fertilization; (B) Incision for removal of the outer shell above the egg's airspace; (C) Humidification of the protective film of the white membrane chorioallantoic membrane with saline solution; (D) Removal of white membrane; (E) Exposure of the Chorioallantoic Membrane of the egg and application of 200 µL of the control solutions or samples and (F).

$$\frac{(301 - \text{Hemorrhage}) \times 5}{300} + \frac{(301 - \text{Vasoconstriction}) \times 7}{300} + \frac{(301 - \text{Coagulation}) \times 9}{300}$$

Figure 2. Formula used for calculations of irritation in the HET-CAM test.

3 RESULTS

3.1 Mouthwash Formulation

After the phase diagram was elaborated by BASTO et al., 2017 (result not yet published) the mouthwash formulation based on licuri oil was obtained, a final composition of the mouthwash formulation is presented in Table 1.

Table 1. Final composition of mouthwash formulation containing fixed licuri oil.

Compounds	Quantity (%/V)
Licuri Fixed Oil	1
Polysorbate 80	6,62
Sorbitol	3
Menthol	0,1
Saccharin Sodium	0,02
Sodium benzoate	0,1
Purified water	q.s.p. 100,00

3.2 Physical-chemical characterization of mouthwash

During the visual inspection, the mouthwash obtained was presented as a transparent and non-formed phase. The analysis by polarized light microscopy confirmed the acquisition of an isotropic system, since the microemulsion did not generate deviation in the plane of polarized light and did not present double refraction.

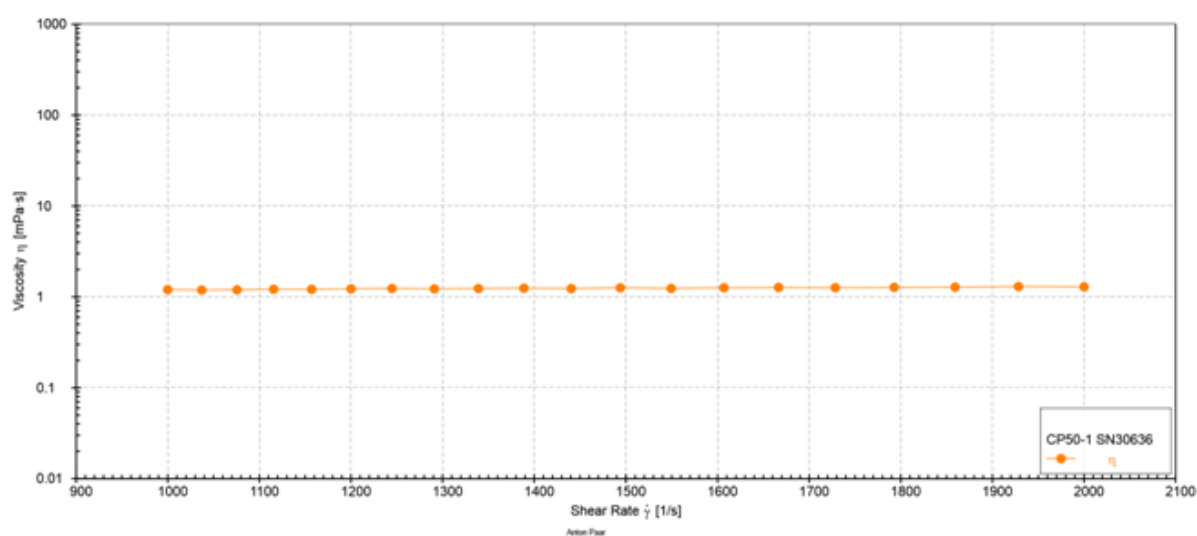
After centrifugation for 30 min, 956 g at room temperature, there was no particle precipitation and phase separation. Table 2 presents the results obtained for some physical-chemical parameters analyzed, while in Figure 3 the rheological behavior determined for the mouthwash can be observed.

3.3 Checkerboard study

The assay revealed that the association between licuri fixed oil (*Syagrus coronata*) and peppermint oil (*Mentha piperita*) showed a synergistic effect against strains of resistant *S. mutans*, showed a fractional inhibitory concentration (CIF) of 0.25 in this way, synergism is considered when the $CIF < 5$ (STEILING et al., 1999), that is both in association cooperated in antimicrobial activity.

Table 2. Physical-chemical characterization of mouthwash formulation.

Characteristic	Result
Droplet Size (nm)	83,85 ($\pm 2,0$)
Polydispersity index	0,287 ($\pm 0,3$)
Zeta potential (mV)	9,3 ($\pm 0,73$)
Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	584,0($\pm 0,20$)
Density (g/mL)	0,02
Viscosity (mPa.s)	1,18
pH	6,5
Droplet Size (nm)	83,85 ($\pm 2,0$)

**Figure 3.** Rheological behavior of mouthwash formulation.

3.4 Anti-bacterial activity of the licuri mouthwash (MIC)

The antibacterial potential of the mouthwash against oral microorganisms was evaluated by the microdilution method in microplate according to the methodology recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute and adapted by FERRARO, 2008. The mouthwash was tested at concentrations of 5 to 60 μL and the negative control. Triplicates of each concentration were made for each sample analyzed. The results of these tests are presented in Table 3.

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of mouthwash on oral microorganisms.

Cepas 1,5×10 ⁹ CFU/ml	µg/mL
<i>Streptococcus mutans</i>	17,5
<i>Streptococcus salivarius</i>	17,5
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	15
<i>Staphylococcus aureus</i>	15
<i>Escherichia coli</i>	*
<i>Candida albicans</i>	-

-: there was no growth in any of the concentrations. * = remained the same as the negative control (viable).

Antimicrobial and antifungal properties of fatty acids have been known for centuries. Some fatty acids, such as undecylenic acid (C10), are used against potent fungal pathogens (JURENKA, 2002). Essential oils are classified as moderately active those with MIC values between 100 and 400 µg/mL. Thus, the licuri-based mouthwash was very active against *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. aureus*, *L. acidophilus* and *C. albicans*, in relation to *E. coli* remained indifferent.

3.5 Nematicidal activity (acute test) with *C. elegans* front bucal mouthwash and commercial mouthwash (Cepacol®)

The licuri mouthwash presented low toxicity in relation to the industrial mouthwash, but both showed higher mortality rates with prolonged exposure (72h). Mortality in the 1% licuri-based mouthwash in 24h was approximately 2.48%, in 48h it was 11.55% and in 72h it increased to 30%. For the 5% licuri based mouthwash, a mortality rate of 5.55% was obtained for 48 hours, 48 hours passed to 25.48% and in 72 hours the rate was 54%, it was suggested for this percentage of mortality that after 48 hours the nematodes began to ingest the medium, thereby intensifying the toxic effect and thus the mortality rate increased.

For 1% cepacol® the results were, in 24h of 9.54%, in 48h of 32% and after 72h it was to 36%, whereas 5% of cepacol® presented results with higher mortality rates, in 24h was of 37%, in 48h of 89% and in 72h of 90%. In addition, it should be noted that the positive controls of the substances had different values in relation to the tested rinses, which was around 18% for the licuri-based mouthwash and 95% for Cepacol®, that is, the industrial mouthwash presented was strongly toxic when the licuri mouthwash was slightly toxic only after 72 hours of exposure (Figure 4).

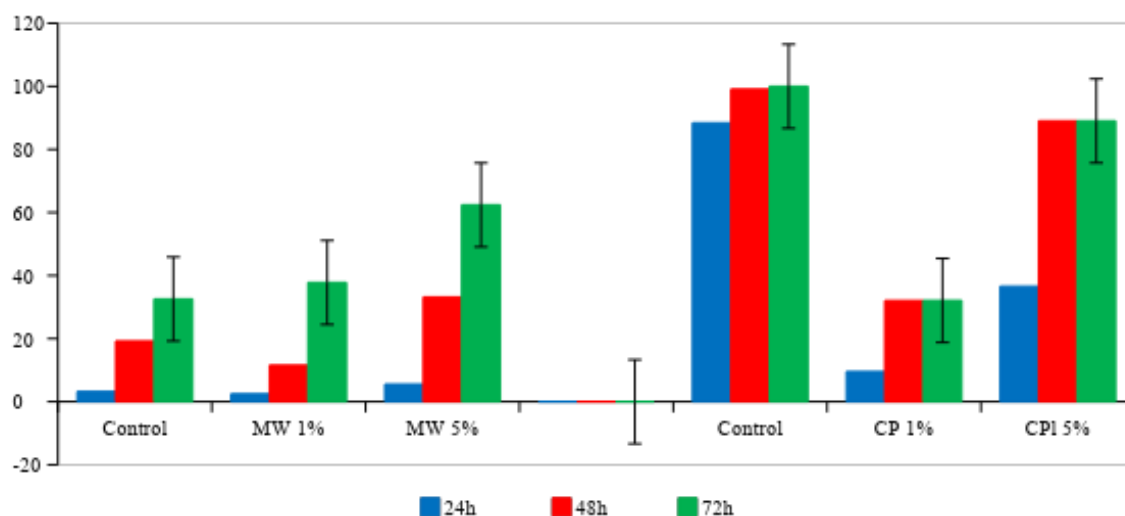


Figure 4. Mortality rate for the licuri-based mouthwash (MW) and industrial mouthwash Cepacol® (CP) at concentrations of 1%, 5% and positive controls after 24h, 48h and 72h.

3.6 HET-CAM Test

The assay was used to analyze the inflammatory and vascular effects caused by the licuri fixed oil base mouthwash. No significant changes were observed in the chorioallantoic membrane of the embryo, without occurrence of hemorrhage and coagulation (score range 0 for both, Table 4), only presenting a slight vasoconstriction at the end of the determined time, but when counting in the equation (Figure 2), it presented a score in the score range of 0.41, establishing itself as non-irritant in the category of irritation scale (Figure 5).

Table 4. Punctuation range X Irritation category, basis for the HET-CAM test.

Score range	Irritation Category
0 – 0,9	Not irritating
1 – 4,9	Slightly irritant
5 – 8,9	Moderate irritant
9 – 21	Severe irritant
0 – 0,9	Not irritating

Figure 3. Rheological behavior of mouthwash formulation.

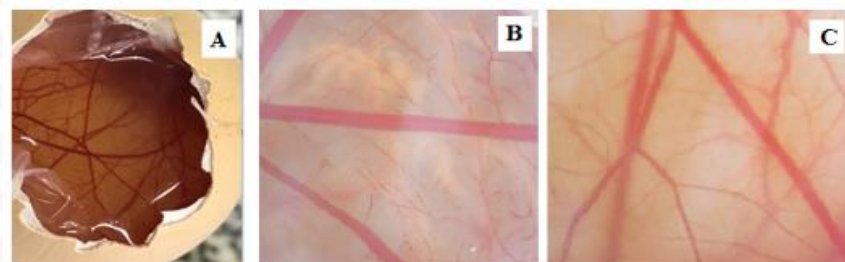


Figure 3. Rheological behavior of mouthwash formulation.

4 DISCUSSION

An antimicrobial substance applied in a mouthwash must present some characteristics that favor the reduction of the formation of bacterial plaques, are: intrinsic effect against oral microorganisms (VAN DER OUDERAA, 1991). Physical-chemical stability, absence of adverse reactions such as spots or interactions with the mucosa, toxicological safety and ecological safety, in other words, the use of the agent should not result in the development of bacterial resistance or stimulate the growth of opportunistic organisms (RANNEY, 1989).

In addition to the active antimicrobials, other substances commonly used in mouthwashes are surfactants, thickeners, flavorings, sweeteners, dyes and preservatives, in concentrations that ensure human safety, stability and also provide organoleptics characteristics to the formulation (VAN DER OUDERAA, 1991). Thus, the emulsion components were selected in order to achieve a more conjugate system possible with the properties described above.

Mint essential oil was used as a refreshing agent and as a flavoring agent, research shows that the associations with menthol promote potentiation of the antimicrobial action due to a mechanism of bacterial cell wall alteration (CIANCIO, 2004). Sodium benzoate was used as a preservative because it is widely accepted and used in medicines, cosmetics and, as a preservative in the food industry, the maximum concentration allowed by cosmetic legislation and 0.5% (ANVISA, 2004). So, the National Health Surveillance Agency classifies mouthwashes as cosmetics personal hygiene, the concentration of preservative used are within the limit allowed by legislation.

Sodium saccharin has been used as a flavoring and mouthwash sweetener because it is a non-cariogenic sweetener that is highly soluble in water and provides a pleasant flavor to the formulation with low caloric value. The presence of alcohols in the rinse formulations still persists in many formulations due to the benefits of their use in the dissolution of active

constituents, refreshment sensation, preservation and germicidal activity (QUIRYNEN et al., 2005).

Some examples of commercially available mouthwashes that contain alcohol in their formulation are Listerine®, Plax®, Cepacol® and Periogard®. However, because of its negative effects associated with alcohol use such as increased cytotoxicity and irritation to oral mucosal cells, dryness, contraindications to use in pregnant women, infants, children, and even increased genotoxic effects on mucosal cells (MASCARENHAS, 2004; PITHON et al., 2011; SOUSA, 2014), in this way, it was decided to formulate an alcohol-free and as natural as possible.

For the incorporation of the oil phase composed of licuri oil was made through a mixture of surfactants/co-surfactant composed from polysorbite 80 and sorbitol in the ratio of 1: 1: 3 (BASTO et al., 2017, unpublished data). The proportion surfactant/co-surfactant used in the formulation was obtained from the pseudoternary phase diagram and was chosen in order to promote the solubilization of the oil in the aqueous phase in a non-toxic way and to adjust the concentrations of the other components of the formulation, thus developing an apparently translucent emulsion with higher aqueous content (approximately 90% of the total composition) and lower viscosity.

The concentration of the licuri fixed oil to be served in the formulation was 1000µg/mL, since the minimum inhibitory concentration was 20µg/mL determined for resistant *S. mutans*.

After the development of mouthwash, some physical-chemical properties were analyzed in order to investigate if the formulation presented characteristics of a system. A microemulsion is characterized by being a thermodynamically stable and isotropically translucent system of two immiscible liquids (oil/water or vice-versa) stabilized by an interfacial surfactant film (ROSSI et al., 2007).

Microemulsion systems are composed of dispersed and dynamic particles whose diameter ranges from 5 to 100 nm (ROSSI et al., 2007; ROSHAN DEEN et al., 2009). The analysis of the droplet size together with the polydispersity index, which indicates the molecular weight distribution of the particles, makes it possible to show, together with other parameters, whether or not to obtain a microemulsified system. Thus, the droplet size of the formulation of approximately 84 nm and the polydispersity index calculated at 0.287 indicate obtaining a microemulsion. Nanogots contribute to a thermodynamically more stable system and decrease the dispersion thereof, since they are less susceptible to sedimentation and flocculation. (; ROSSI et al., 2007; BASTO et al., 2016).

After centrifugation for 30 min, 956 g at room temperature, there was no particle precipitation or phase separation, which suggested a stable single phase isotropic system. Through the zeta potential, the trajectory of the charged particles was evaluated by means of a liquid dispersion, that is, the electrostatic interaction of the particles presents in the dispersed medium.

The nonzero zeta potential, which is negative or positive, indicates that there is repulsion between the particles of the system, which favors the stability of the dispersion, since these particles are less likely to aggregate (PATEL et al., 2010). Thus, the determination of the zeta potential of the mouthwash in 9.3 mV promotes the obtaining of a stable system, due to the positive charge of the particles.

Conductivity assessments provide an important means of solving aqueous or oily continuous fields in a microemulsified system (LAWRENCE and REES, 2000). Thus, the calculated conductivity at 584.0 μ S/cm for the formulation indicates the ability of the aqueous solution to conduct electric current due to the presence of ions, which suggests an oil-in-water microemulsion with direct microdroplets, that is, an aqueous system in which the oily phase is dispersed. Then, the polar head of the surfactant is directed to the aqueous continuous phase, while the non-polar tail is directed into the hydrophobic interior of the micelle (GOMES, 2009).

The viscosity can be understood as the resistance to the flow of a liquid, being controlled by the internal frictional forces between the atoms of that liquid. The greater the flow of a liquid on a given surface the better the adhesion. The shear stress versus shear gradient graph presented in Figure 2 shows that through the linear relationship obtained the formulation has a characteristic rheological behavior of Newtonian fluids, which is expected for most dissolved solutions of surfactants (ionic or non-ionic) (ROSSI et al., 2007).

Thus determining that the constant of proportionality of the line is the viscosity itself calculated at 1.18 cP. Thus, the rinse has uniform viscosity independent of the degree of deformation, a characteristic favorable to maintaining viscosity regardless of factors such as agitation and rinsing time, for example. Another important property of mouthwashes is their pH value, which when below 5,5 is considered critical for the dissolution of dental tissues in relation to the time of exposure (LIMA et al., 2005). Thus, it is ideal for the pH of a mouthwash to remain above this value and close to the physiological pH of the oral cavity, around 7 (SOUSA, 2014). Thus, the pH 6.5 presented by the formulation is within acceptable limits.

The Checkerboard method is a technique used to evaluate in vitro the antimicrobial activity of combinations of antimicrobial agents. The conveniences of the method are several (1) easy to understand, (2) simple mathematical interpretation and calculations, (3) can be used in microdilution systems and (4) a technique commonly used in synergism studies (ONYEJI et al., 1994).

Studies of synergism between natural products and some antibiotics have been proposed in recent years by several researchers. MANDALARI et al. (2010) analyzed the antimicrobial potential of polyphenols extracted from almonds, showing synergistic and indifferent interactions on *Samonella enterica* and *Staphylococcus aureus*. FERNANDES (2011) observed synergistic effects of *Psidium guinean* Swartz in combination with antimicrobial agents on strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and PUHL et al. (2011) found synergism with crude extract and fractions of *Piper gaudichaudianum* Kuntze with antibiotics of (ceftriaxone, vancomycin, and tetracycline).

These studies have confirmed that extracts and other substances from medicinal plants not only have antibacterial qualities, but also have the ability to interfere with antibiotic activity, demonstrating a synergistic or antagonistic effect. In this work, the antimicrobial effects of the interaction of the fixed oil of licuri and the essential oil of mint against *S. mutans* were evaluated by the most effective MIC of each sample combined and the calculation of their respective CIFs. It also showed synergistic activity (MIC = 0.25). It is believed that the fixed oil of licuri because it is formed by long chains of fatty acids promoted the fixation of volatile peppermint oil, which, it is an essential oil has a higher capacity of volatilization, in this way, the union of both oils required advantages for both and developed the potentialization of the system.

Antimicrobial activity was performed with different oral microorganisms evaluated as significant in the formation of dental caries and other oral infections. The complete mouthwash formulation exhibited a minimum inhibitory concentration of approximately 20µg/mL. Therefore, according to the classification of SALEEM et al. (2010), mouthwash can be considered as strongly active against *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. aureus*, *L. acidophilus* and *C. albicans*.

Studies with *S. coronata* oil fixed and essential oil pure showed similar activity against *S. aureus*, from which the activity was extremely strong with concentrations of 0.002 µL/mL to 0.08 µL/mL for eleven of the 16 *S. aureus* strains tested in the same way, activities against the fixed oil of licuri (to approximately 56%) in microemulsion solution developed from the

pseudoternary phase diagram showed activity against resistant *S. mutans*, with a concentration about 20 µg/ml. (HUGHES et al., 2013; SILVA BESSA et al., 2016).

Other studies with fatty acids of different plants showed the action of these acids against *S. aureus*, so that these acids involved in the interruption of the cell membrane inducing energy interference within the bacterial cell (KENNY et al., 2009). In the present study, it was found that the presence of a fixed oil extracted from *Verbascum undulatum* showed moderate activity (MIC = 62.5 µg/ml for *S. aureus*). In its mechanism of action, there were holes/pores in the bacterial membrane causing cell lysis (MAGIATIS et al., 1998).

Through the results obtained, it was verified that the mouthwash presented moderate or active inhibitory activity on the microbial growth for the gram-positive species tested. These results appeared to be quite promising, especially for gram-positive bacteria, since the mouthwash showed an inhibitory effect on both the most sensitive and the most resistant strains, for example, strains of *S. aureus* and *S. mutans* are multidrug-resistant, being sensitive only to more potent antibiotics such as Vancomycin, an antimicrobial that provides significant toxicity and requires medical monitoring in its administration (MARANGONI and ROUSSEAU, 1998; SOUZA et al., 2005).

The low or even absent inhibitory activity of the nasal spray on Gram-negative bacteria, especially *E. coli*, may be related to the structural differences of these bacteria in relation to gram-positive bacteria; presence of an outer membrane on the peptidoglycan, capsule presence, porins (KONEMAN et al., 2001), may be blocking the action of the bioactive components of the mouthwash. Another assumption for this resistance may be because the potentially active substances are present in very low concentrations.

The model with *C. elegans* presents a series of experimental tribulations that make this test a very productive animal model with an increasing number of publications in developmental biology, genetics, aging, toxicity and ecotoxicology (DIOGO and MOTA, 2001). Its short life cycle of approximately 21 days allows studies to be carried out in a period of time practically impossible in classic mammalian models, as well as many possibilities related to genetics, since about 60% of the genes of *C. elegans* have homologues in mammals (KALETTA and HENGARTER, 2006).

The toxicity to nematodes is shown to be a promising way to identify the pharmacological effects of medicinal plants (AN and BLACKWELL, 2003), which is analyzed through behavioral responses to exposure (HOSS and WILLIAM, 2009; WEBER and TRAUNSPURGER, 2012). Thus, the mortality tests with the mouthwashes (Licuri and Cepacol®) presented discrepant results regarding pure substances (positive controls), where

the industrial mouthwash showed to be extremely toxic obtaining a mortality rate of almost 100% of the population after 72 h, the licuri-based mouthwash obtained a maximum percentage of mortality after 72 hours of exposure at a maximum rate of 32%.

Studies have reported similar data compared to licuri products (BASTO et al., 2017, undated publications), where at concentrations slightly above the relapsing had mortality rates lower than 40% with 72 hours of exposure. For the concentrations of the 1% rinses the results were similar with low variations, but considering the standard deviation the mortality rate was almost null for both. In the 5% concentrations, the results were higher for Cepacol®, where it showed rates of approximately 90% of mortality against 60% for the licuri mouthwash, these rates were weighted after 72h of exposure, thus, the effect of the active substances (AVERY and SHTONDA, 2003) and their ingestion, their effect increased after the second 48-h count (Figure 4).

A study carried out with fixed oil of *Pterodon emarginatus* at different concentrations for a period of up to 30 minutes presented several benefits for nematode populations *C. elegans*, where it increased the longevity of nematodes without affecting their reproduction, under oxidative stress conditions, the oil provided protection against pro-oxidants, decreased the production of reactive oxygen and induced the increase of levels of antioxidant enzymes, in addition, it was observed that the oil reduced the accumulation of lipids and triglycerides. Thus, low concentrations exposed during short intervals of oil exhibited antioxidant capacity, promoting greater longevity without affecting the reproductive capacity of *C. elegans* (DAL FORNO et al., 2016).

This assay aims at the semi-quantitative evaluation of the irritant potential of a substance (soluble products, emulsions, gels and oils) on the chicken embryo egg chorioallantoic membrane on the tenth day of incubation.

The test is based on observation (microscopic and naked eye) of the irritating effects (vasoconstriction, hemorrhage and coagulation), that after 5 minutes a scale is obtained that considers the phenomena observed. (BRASIL, 2012). It is of great relevance the toxicological evaluation of micro or nanostructured materials, due to its dimensions and shapes, often able to transpose tissues and cause cellular damage (RAMPINO et al., 2013).

In the present study, the mouthwash presented a non-irritant according to HET-CAM, which allows its use in cosmetics and in parallel its human use.

Conclusions

Analyzing the results obtained in this work according to the methods used, it can be concluded that: the liqueur-based mouthwash presented as a microemulsion with great stability, interacted synergistically with the essential oil of mint potentiating the formulation, thus, the concentration for the bactericidal activity was low, as it did not present toxicity to *C. elegans* and the irritability test proved to be non-irritant.

This study evidenced the high pharmacological value of licuri oil, generating the development of new technologies, training and capacity building for human use with the aim of propagating advanced techniques and new strategies in the study of oral diseases. It is in this academic and social context that such importance is justified for the study and development of new technologies with licuri oil.

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could compromise the results obtained in this work.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Foundation for Support to Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) for the financial support granted in the form of a scholarship to the first author. The authors also thank the company Anton Paar for the analyzes carried out.

5 REFERÊNCIAS

AMBROSIO, S.R.; SCHORR, K.; DA COSTA, F.B. Terpenoids of *Viguiera arenaria* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 221-224, 2004.

AN, J. H., & BLACKWELL, T. K. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. **Genes & development**, v. 17, n. 15, p. 1882-1893, 2003.
ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de estabilidade de produtos** cosméticos. Brasília, DF, 2004.

ASADOORIAN, J. CDHA position paper on commercially available over-the-counter oral rinsing products. **Canadian Journal of Dental Hygiene**, v. 40, n. 4, p. 01-13, 2006.

AVERY, L., & SHTONDA, B. B. Food transport in the *C. elegans* pharynx. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 14, p. 2441-2457, 2003.

BASTO, S. R. L., FERREIRA-SILVA, J. C., SILVA, F. L. A., ALEIXO, G. A. S., STAMFORD, T. C. M., SILVA, M. V., & CORREIA, M. T. S. Emulsão e microemulsão: novos sistemas de liberação controlada. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 10, n. 1-4, p. 25-33, 2016.

BRITTO, I.M.P.A.; CALIL, C.M.; MÜLLER, V.M.; PANNUTI, C.M.; PUSTIGLIONI, F.E. O uso de enxaguatórios bucais no controle da halitose. **Revista de Periodontia**, v. 19, n. 4, p. 61-67, 2009.

CIANCIO, S.G. Mouthrinses can be an effective adjunct to mechanical cleaning in the fight against plaque. **Dimensions of Dental Hygiene**, v. 2, n.11, p. 24-29, 2004.

CREPALDI, I. C., ALMEIDA-MURADIAN, L. D., RIOS, M. D. G., PENTEADO, M. V. C., & SALATINO, A. Composição nutricional do fruto de licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 2, p. 155-159, 2001.

DAL FORNO, A. H., CÂMARA, D., PARISE, B., RODRIGUES, C. F., SOARES, J. J., WAGNER, R., & FARIAS, F. M. Antioxidant and lipid lowering effects of dried fruits oil extract of *Pterodon emarginatus* in *Caenorhabditis elegans*. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016, In Press.

DIOGO, A., & MOTA, M. **Caenorhabditis elegans: Modelo Biológico para o século XXI**. Laboratório de Nematologia/ICAM. Universidade de Évora. Évora, 2001.

DRUMOND, M. A.; KILL, L. H. P.; LIMA, P. C. F. Avaliação e identificação de ações prioritárias, para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma caatinga: **Seminário “Biodiversidade da Caatinga”**, 2000.

FERNANDES, T. G. **Efeito sinérgico do estado aquoso das folhas de *Psidium guineense* Swartz em associação com agentes antimicrobianos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* multidroga resistentes**. 2011.

FERRARO, M. J. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. NCCLS, 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Part III. Department of health and human services. 21 CFR. Part 356. Oral health care drug products of over the counter human use; antigingivitis / antiplaque drug products. **Federal Register**, v. 68, n.103, 2003.

GELEJNSE, J. M., WITTEMAN, J. C. M., BAK, A. A. A., DEN BREIJEN, J. H., & GROBBEE, D. E. Reduction in blood pressure with a low sodium, high potassium, high magnesium salt in older subjects with mild to moderate hypertension. **British Medical Journal**, v. 309, n. 6952, p. 436-440, 1994.

GOMES, D.A.A. **Aplicação de microemulsões na solubilização de frações pesadas do petróleo**. 2009. 90p. (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

GUTIERREZ, J., BARRY-RYAN, C., & BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 1, p. 91-97, 2008.

HITOSHI, K., KOZO, H., SHINGU, T., YOSHIO, K., OHTANI, H., OKURA, Y., ... & KAJIYAMA, G. Opposite effects on cholesterol metabolism and their mechanisms induced by dietary oleic acid and palmitic acid in hamsters. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1258, n. 3, p. 251-256, 1995.

HÖSS, S., & WILLIAMS, P. L. Ecotoxicity testing with nematodes. Nematodes as Environmental Indicators. CAB International, Cambridge, MA, USA, p. 208-224, 2009.

HUGHES, Alice Ferreira da Silva et al. Antimicrobial activity of *Syagrus coronata* (Martius) Beccari. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 2, p. 269-274, 2013.

JURENKA, S. J. Undecylenic acid-a monograph. **Alternative Medicine Review**, v. 2, v. 1, 2002.

KALETTA, T., & HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 5, p. 387-399, 2006.

KENNY, J. G., WARD, D., JOSEFSSON, E., JONSSON, M., HINDS, J., REES, H. H., & HORSBURGH, M. J. The *Staphylococcus aureus* response to unsaturated long chain free fatty acids: survival mechanisms and virulence implications. **Plos One**, v. 4, n. 2, p. e4344, 2009.

KONEMAN, E. W., ALLEN, S. D., JANDA, W. M., SCHRECKENBERGER, P. C., & WINN JR, W. C. **Diagnóstico Microbiológico-Texto e Atlas Colorido**,. 5ª MEDSI. Rio de Janeiro, RJ, p. 141-147, 2001.

KONOFAL, E., LECENDREUX, M., ARNULF, I., & MOUREN, M. C. Iron deficiency in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v. 158, n. 12, p. 1113-1115, 2004.

LAWRENCE, M.J.; REES. G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, n.1, p. 89-121, 2000.

LEAL, I. R., SILVA, J. D., TABARELLI, M., & LACHER JR, T. E Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 139-146, 2005.

LEAL, L. B., SOUSA, G. D., SEIXAS, K. B., SOUZA, P. H. N. D., & SANTANA, D. P. D. Determination of the critical hydrophile-lipophile balance of licuri oil from *Syagrus coronata*: application for topical emulsions and evaluation of its hydrating function. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 1, p. 167-173, 2013.

LEITÃO, D. P. S., Silva Filho, A. A., Polizello, A. C. M., Bastos, J. K., & Spadaro, A. C. C. Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 11, p. 1834-1839, 2004.

LIMA, A.L.; VALENÇA, A.M.G.; ALBUQUERQUE, F.R.; SILVA, N.B. Análise do pH e da viscosidade nos enxaguatórios bucais fluoretados disponíveis comercialmente na cidade de João Pessoa-PB. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria Clínica Integrada**, v. 5, n. 3, p. 223-228, 2005.

LINS, U., BARROS, C. F., DA CUNHA, M., & MIGUENS, F. C. (2002). Structure, morphology, and composition of silicon biocomposites in the palm tree *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. **Protoplasma**, 220(1), 0089-0096.

MAGIATIS, P., MITAKU, S., TSITSA, E., SKALTSOUNIS, A. L., & HARVALA, C. Verbascoside derivatives and iridoid glycosides from *Verbascum undulatum*. **Natural Product Letters**, v. 12, n. 2, p. 111-115, 1998.

MANDALARI, G., BISIGNANO, C., D'ARRIGO, M., GINESTRA, G., ARENA, A., TOMAINO, A., & WICKHAM, M. S. J. Antimicrobial potential of polyphenols extracted from almond skins. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 83-89, 2010.

MARANGONI, A. G. & ROUSSEAU, D. Chemical and enzymatic modification of butterfat and butterfat-canola oil blends. **Food Research International**, v. 31, n. 8, p. 595-599, 1998.

MASCARENHAS, A.K. Inconclusive evidence to suggest that alcohol containing mouthwash increases the risk of oropharyngeal cancer. **Journal of Evidence-Based Dental Practice**, v. 4, p. 249-250, 2004.

MIGUEL, M. G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 291-312, 2010.

MORAES, F. P., & COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

ONYEJI, C. O., NIGHTINGALE, C. H., & MARANGOS, M. N. Enhanced killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in human macrophages by liposome-entrapped vancomycin and teicoplanin. **Infection**, v. 22, n. 5, p. 338-342, 1994.

PATEL V.; KUKADIYA, H.; MASHRU, R.; SURTI, N.; MANDAL, S. Development of Microemulsion for Solubility Enhancement of Clopidogrel. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 4, p. 327-334, 2010.

PITHON, M.M.; SANTOS, A.M.; FREITAS, L.M.A.; SOUZA, R.A.; SANTOS, R.L.; MARTINS, F.O.; ROMANOS, M.T.V. In vitro assessment of the cytotoxicity of mouthwashes with and without alcohol. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Bucal-Maxilo-Facial**, v. 11, n. 1, p. 9-12, 2011.

PORTO, T.S.; FURTADO, N.A.J.C.; HELENO, V.C.G.; MARTINS, C.H.G.; DA COSTA, F.B.; SEVERIANO, M.E.; SILVA, A.N.; VENEZIANI, R.C.S. Antimicrobial ent-primarane diterpenes from *Viguiera arenaria* against Gram-positive bacteria. **Fitoterapia**, v. 80, p. 432-436, 2009.

PUHL, M. C. M. N., CORTEZ, D. A. G., UEDA-NAKAMURA, T., & NAKAMURA, C. V. Antimicrobial activity of *Piper gaudichaudianum* Kuntze and its synergism with different antibiotics. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 9925-9938, 2011.

QUIRYNEN, M.; SOERS, C.; DESNYDER, M.; DEKEYSER, C.; PAUWELS, M.; VAN STEENBERGHE, D.A.A. 0.05% cetyl pyridinium chloride/0.05% chlorhexidine mouthrinse during maintenance phase after initial periodontal therapy. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, p. 390-400, 2005.

RAMPINO, A., BORGOGNA, M., BLASI, P., BELLICH, B., & CESÀRO, A. Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, n. 1, p. 219-228, 2013.

RANNEY, R. R. Criteria for efficacy of plaque control agents for periodontal-disease-microbiology. **Journal of Dental Research**, v. 68, p. 1655-1660, 1989.

ROSHAN DEEN, G., OLIVEIRA, C. L., & PEDERSEN, J. S. Phase behavior and kinetics of phase separation of a nonionic microemulsion of C12E5/water/1-chlorotetradecane upon a temperature quench. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 20, p. 7138-7146, 2009.

ROSSI, C.G.F.T.; DANTAS, T.N.C.; NETO, A.A.D.; MACIEL, M.A.M. Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural. Série Ciências Exatas e da Terra**, v. 26, n.1, p. 45-66, 2007.

S. R. L. BASTO, F. L. A. SILVA, J. C. FERREIRA-SILVA, F. J. L. FRANÇA, C. A. LUNA, G. A. P. SANTOS, T. C. M. STAMFORD, M. V. SILVA, M. T. S. CORREIA, 2017, result not yet published.

SALEEM, M.; NAZIR, M.; ALI, M.S.; HUSSAIN, D.; LEE, Y.S.; RIAZA, N.; JABAR, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Products Reports**, v. 27, p. 238-254, 2010.

SILVA BESSA, C. M. A., DO NASCIMENTO, R. S., ALVES, R. C. C., ANSELMO, J. E. M., DA SILVA, A. P. S. A., DA SILVA, A. G., & DOS SANTOS CORREIA, M. T. *Syagrus coronata* seed oils have antimicrobial action against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 23, p. 310-317, 2016.

SOUSA, I. P. **Avaliação da atividade de óleos essenciais sobre micro-organismos bucais e efeito de formulação de exagutório bucal contendo óleo essencial sobre biofilme de micro-organismo cariogênio**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. 2014.

SOUZA, M. V., REIS, C., & PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, 2005.

STEILING, W., BRACHER, M., COURTELLEMONT, P., & DE SILVA, O. The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. **Toxicology In Vitro**, v. 13, n. 2, p. 375-384, 1999.

VAN DER OUDERAA, F.J.G. Anti-plaque agents. Rationale and prospects for prevention of gingivitis and periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 18, p. 447-454, 1991.

VARGAS, A., ZEISSER-LABOUÈBE, M., LANGE, N., GURNY, R., & DELIE, F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 11, p. 1162-1176, 2007.

WEBER, S., & TRAUNSPURGER, W. Food choice of *Panagrolaimus* cf *thienemanni* and *Poikilolaimus* spec. in dependence of food source and food density. **Nematology**, v. 15, p. 291-301, 2012.

4 CONCLUSÃO

As emulsões se apresentam como formas farmacêuticas de liberação controlada, tanto para uso veterinário quanto para uso humano, e têm sido desenvolvidas adotando tecnologias simples, eficientes e de baixo custo. Os sistemas microestruturados promovem a liberação gradual dos compostos, ampliam o tempo de contato e, por apresentarem frações com tamanho reduzido, contribuem para a deposição de um maior número de partículas na superfície da célula-alvo, além de expor essa célula a uma maior quantidade da substância ativa.

Nesse contexto é interessante ressaltar que o diagrama de fases pseudoternário tornou as formulações tanto de emulsão quanto de microemulsão mais visíveis em decorrência das concentrações terem sido minuciosamente determinadas para atingir os resultados esperados.

O enxaguatório bucal a base de licuri apresentou-se como uma microemulsão de grande estabilidade e por ter interagido de forma sinérgica com o óleo essencial de menta potencializou a formulação de tal forma que, mesmo em baixa concentração, mostrou atividade bactericida sem apresentar toxicidade frente ao *C. elegans* e irritabilidade frente ao teste de HET-CAM.

Finalmente, os resultados obtidos utilizando o óleo de licuri frente a afecções orais contribuíram para reafirmar tanto o potencial farmacológico da Caatinga quanto a necessidade de instituir medidas para sua preservação.

REFERÊNCIAS

- AAS, J. A., PASTER, B. J., STOKES, L. N., OLSEN, I., & DEWHIRST, F. E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5721-5732, 2005.
- ALBUQUERQUE, U. D. A etnobotânica no nordeste brasileiro. **Tópicos atuais em Botânica. Embrapa/Sociedade Botânica do Brasil. Brasília/São Paulo**, p. 241-249, 2000.
- ALLWOOD, A. C., WALTER, M. R., KAMBER, B. S., MARSHALL, C. P., & BURCH, I. W. Stromatolite reef from the Early Archaean era of Australia. **Nature**, v. 441, n. 7094, p. 714-718, 2006.
- ALVES, D., COSTA, A. L., ALMEIDA, R. F., CARVALHO, J. F., & FELINO, A. Cloreto de cetilpiridínio-revisão da literatura. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 53, n. 3, p. 181-189, 2012.
- AMBROSIO, S. R., FURTADO, N. A., DE OLIVEIRA, D. C., DA COSTA, F. B., MARTINS, C. H., DE CARVALHO, T. C. Antimicrobial activity of kaurane diterpenes against oral pathogens. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, n. 5-6, p. 326-330, 2008.
- ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.
- ANTONIO, G. D., TESSER, C. D., & MORETTI-PIRES, R. O. Contribuições das plantas medicinais para o cuidado e a promoção da saúde na atenção primária. **Interface-Comunicação, Saúde, Educação**, v. 17, n. 46, p. 615-633, 2013.
- ANVISA –AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Resolução - RDC Nº-26, DE AGÊNCIA 13 DE MAIO DE 2014, Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf
- AQUINO, D. R., CORTELLI, J. R., DA SILVA FARIA, I., SIQUEIRA, A. F., & CORTELLI, S. C. Ação antimicrobiana do triclosan sobre microbiota cariogênica. **Revista Biociências**, v.10, 2008.
- ARCOVERDE, J. H. V., CARVALHO, A. D. S., DE ALMEIDA NEVES, F. P., DIONÍZIO, B. P., PONTUAL, E. V., PAIVA, P. M. G., ... & CARNEIRO-DA-CUNHA, M. D. G. Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. **Natural Product Research**, v. 28, n. 16, p. 1297-1301, 2014.
- AVANCINI, M. M.; TEGA, G. Caatinga: um bioma entre a devastação e a conservação. **ComCiência**, n. 149, p. 0-0, 2013.
- AVILA, M., OJCIUS, D. M., & YILMAZ, Ö. The oral microbiota: living with a permanent guest. **DNA and cell biology**, v. 28, n. 8, p. 405-411, 2009.
- BANAS, J. A. Virulence properties of Streptococcus mutans. **Frontiers Bioscience**, v. 9, n. 10, p. 1267-77, 2004.

BELVISO, S., GHIRARDELLO, D., GIORDANO, M., RIBEIRO, G. S., DE SOUZA ALVES, J., PARODI, S., ... & ZEPPA, G. Phenolic composition, antioxidant capacity and volatile compounds of licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari) fruits as affected by the traditional roasting process. **Food research international**, v. 51, n. 1, p. 39-45, 2013.

BOWEN, W. H. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium?. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 13, n. 2, p. 126-131, 2002.

BRITTO, I. M. P. D. A., CALIL, C. M., MÜLLER, V. M., PANNUTI, C. M., & PUSTIGLIONI, F. E. O uso de enxaguatórios bucais no controle da halitose. **Periodontia**, v. 19, n. 4, p. 61-67, 2009.

BURNE, R. A. Oral streptococci products of their environment. **Journal of Dental Research**, v. 77, n. 3, p. 445-452, 1998.

CAETANO, S. K. Obtenção de um dentifrício contendo extrato seco por aspersão padronizado de *Libidibia ferrea* com atividade antimicrobiana contra patógenos bucais. 2014.

CARVALHO, M. R. A. C. P., & COELHO, N. R. A. Leite de Coco: aplicações funcionais e tecnológicas. **Estudos**, v. 36, n. 4, p. 851-865, 2009.

CHAMBRONE, L., LIMA, L. A., & CHAMBRONE, L. A. Prevalência das doenças periodontais no Brasil. **Odonto**, v. 16, n. 31, p. 69-76, 2009.

COSTA-LOTUFO, L. V., L. V., MONTENEGRO, R. C., ALVES, A. P. N., MADEIRA, S. V. F., PESSOA, C., MORAES, M. E. A., & MORAES, M. O. A. Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CREPALDI, I. C., ALMEIDA-MURADIAN, L. D., RIOS, M. D. G., PENTEADO, M. V. C., & SALATINO, A. Composição nutricional do fruto de licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 2, p. 155-159, 2001.

DAMGAARD, L. R., NIELSEN, L. P., & REVSBECH, N. P. Methane microprofiles in a sewage biofilm determined with a microscale biosensor. **Water research**, v. 35, n. 6, p. 1379-1386, 2001.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-181, 2012.

DESBOIS, A. P., SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1629-1642, 2010.

DUQUE, J. G. Solo e água no polígono das secas. In: **Coleção mossoroense**. Banco do Nordeste do Brasil, 1980.

ELEY, B. M. Periodontology: antibacterial agents in the control of supragingival plaque—a review. **British dental journal**, v. 186, n. 6, p. 286-296, 1999.

FARDELONE, L. C., BRANCHI, B. Â. O setor de biofármacos e as oportunidades para o Brasil. **Revista da FAE**, v. 9, n. 2, 2016.

FARDIN, N. M., ANTONIO, E. L., MONTEMOR, J. A. S., DA VEIGA, G. L., TUCCI, P. J. F., CAMPOS, R. R. Digitoxin improves cardiovascular autono miccontrol in ratswithheartfailure. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 94, n. 6, p. 643-650, 2016.

FARDIN, R. F., ANDRADE, I. P., XAVIER, K. B. C., & NUNES, A. P. F. Avaliação in vitro das diferentes concentrações de clorexidina no controle da placa dental bacteriana. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde/Brazilian Journal of Health Research**, 2011.

FOGLIO, M. A., QUEIROGA, C. L., SOUSA, I. D. O., & RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, p. 1-8, 2006.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Oral health care drug products for over-the-counter human use antigingivitis/antiplate drug products; establishment of a monograph; proposed rules. **FedRegist**, v. 68, n. 103, p. 32232-87, 2003.

GIULIETTI, A. M., BOCAGE NETA, A. L., CASTRO, A. A. J. F., GAMARRA-ROJAS, C. F. L., SAMPAIO, E. V. S. B., VIRGÍNIO, J. F., ... & HARLEY, R. M. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**, p. 48-90, 2004.

HENDERSON, A., FISCHER, B., SCARIOT, A., PACHECO, M. A. W., & PARDINI, R. Flowering phenology of a palm community in a central Amazon forest. **Brittonia**, v. 52, n. 2, p. 149-159, 2000.

HITOSHI, K., KOZO, H., SHINGU, T., YOSHIO, K., OHTANI, H., OKURA, Y., ... & KAJIYAMA, G. Opposite effects on cholesterol metabolism and their mechanisms induced by dietary oleic acid and palmitic acid in hamsters. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1258, n. 3, p. 251-256, 1995.

HUGHES, A.F.D.S., LIMA, F.G.D., LUCCHESI, A.M., GÓES NETO, A., UETANABARO, A.P.T. Antimicrobial activity of *Syagrus coronata* (Martius) Beccari. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 2, p. 269-274, 2013.

JAFARI, S. M., HE, Y., & BHANDARI, B. Encapsulation of nanoparticles of d-limonene by spray drying: role of emulsifiers and emulsifying techniques. **Drying Technology**, v. 25, n. 6, p. 1069-1079, 2007.

JENKINSON, H. F., & LAMONT, R. J. Oral microbial communities in sickness and in health. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 12, p. 589-595, 2005.

KELLER, K. Legal requirements for the use of phytopharmaceutical drugs in the Federal Republic of Germany. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 32, n. 1-3, p. 225-229, 1991.

KIVES, J., ORGAZ, B., & SANJOSÉ, C. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 52, n. 2, p. 123-127, 2006.

KONOFAL, E., LECENDREUX, M., ARNULF, I., & MOUREN, M. C. Iron deficiency in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v. 158, n. 12, p. 1113-1115, 2004.

KOO, H., XIAO, J., & KLEIN, M. I. Extracellular polysaccharides matrix-an often forgotten virulence factor in oral biofilm research. **International journal of oral science**, v. 1, n. 4, p. 229, 2009.

KURAMITSU, H. K. Molecular genetic analysis of the virulence of oral bacterial pathogens: an historical perspective. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 14, n. 5, p. 331-344, 2003.

LANG, G., & BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, n. 1, p. 13-39, 2012.

LEMOIS, J. A., ABRANCHES, J., & BURNE, R. A. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. **Current issues in molecular biology**, v. 7, n. 1, p. 95-108, 2005.

LEY, R. E., LOZUPONE, C. A., HAMADY, M., KNIGHT, R., & GORDON, J. I. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 776-788, 2008.

LIEBERMAN, S., ENIG, M. G., & PREUSS, H. G. . A review of monolaurin and lauric acid: natural virucidal and bactericidal agents. **Alternative & Complementary Therapies**, v. 12, n. 6, p. 310-314, 2006.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiological reviews**, v. 50, n. 4, p. 353, 1986.

MACÊDO, J. A. B. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria de farmacêutica. **Revista Fármacos & Medicamentos**, v. 2, n. 7, p. 19-24, 2000.

MACHADO, A. C., & OLIVEIRA, R. C. Phytotherapy medicines in dentistry: evidence and perspectives on the use of "Aroeira-do-sertão" (*Myracrodruon Urundeuva* Allemão). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 283-289, 2014.

MAH, T. F. C., & O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

MAIA, G. N. **Caatinga árvores e arbustos e suas utilidades**. Leitura&Arte, 2004.

MARCOTTE, H., & LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 1, p. 71-109, 1998.

MARION, J., NAKASHIMA, L., PAVAN, K., ARRUDA, M. E. B. F., & MORAIS, C. A. H. D. Clorexidina e suas aplicações na Endodontia: revisão da literatura. **Dental Press Endodontics**, p.36-54, 2013.

MARSH, P. D. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. **Dental Clinics of North America**, v. 54, n. 3, p. 441-454, 2010.

MARSH, P. D., & BRADSHAW, D. J. Physiological approaches to the control of oral biofilms. **Advances in dental research**, v. 11, n. 1, p. 176-185, 1997.

MARSH, P. D., MOTER, A., & DEVINE, D. A. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. **Periodontology 2000**, v. 55, n. 1, p. 16-35, 2011.

MEZNI, F., MAAROUFI, A., MSALLEM, M., BOUSSAID, M., KHOUJA, M. L., & KHALDI, A. Fatty acid composition, antioxidant and antibacterial activities of Pistacialentiscus L. fruit oils. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 39, p. 5266-5271, 2012.

MIGUEL, M. G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. **Flavour and FragranceJournal**, v. 25, n. 5, p. 291-312, 2010.

MILLEZI, A. F. Ação de óleos essenciais sobre biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. 2012.

MIRANDA, K. E. D. S. Qualidade e atividade antioxidante de fruto e seu óleo de genótipos do licurizeiro (*Syagrus coronata*). 2011.

MONFRIN, R.C.P.; RIBEIRO, M.C. Avaliação in vitro de anti-sépticos bucais sobre a microbiota da saliva. **Revista Da Associacao Paulista De Cirurgiões Dentistas**, v.54, n.1, p.401-407, 2000.

MONTANARI, C. A., & BOLZANI, V. D. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, p. 105-111, 2001.

MORAES, F. P., & COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MOURA, L. B. **Estudo do crescimento bacteriano na presença de óleos essenciais de *Dysphania ambrosioides* L. e *Ocimum campechianum* mill. para avaliar seus potenciais como antissépticos bucais.** 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará.

NEWBRUN, E. *Cariologia*. 2. São Paulo: Ed. Santos, p. 17-40, 1988.

NOBLICK, L. R. **The indigenous palms of the state of Bahia, Brazil.** 1991. Tese de Doutorado.

O'TOOLE, G., KAPLAN, H. B., & KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000.

PRADO, D. E. As caatingas da América do Sul. **Ecologia e conservação da Caatinga**, v. 2, p. 3-74, 2003.

REN, D., ZUO, R., BARRIOS, A. F. G., BEDZYK, L. A., ELDRIDGE, G. R., PASMORE, M. E., & WOOD, T. K. Differential gene expression for investigation of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 7, p. 4022-4034, 2005.

RUIZ-RODRIGUEZ, A., REGLERO, G., & IBAÑEZ, E. Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 51, n. 2, p. 305-326, 2010.

SASIDHARAN, S., CHEN, Y., SARAVANAN, D., SUNDRAM, K. M., & LATHA, L. Y. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 1, 2011.

SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. The science of reactive hair-care products: a review of changing natural hair appearances. **Cosmetics and toiletries**, v. 113, n. 5, p. 39-44, 1998.

SEGALL, S. D., ARTZ, W. E., RASLAN, D. S., FERRAZ, V. P., & TAKAHASHI, J. A. Ouricuri (*Syagrus coronata*) triacylglycerol analysis using HPLC and positive ion electrospray tandem MS. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 2, p. 143-149, 2004.

SILVA BESSA, C. M. A., DO NASCIMENTO, R. S., ALVES, R. C. C., ANSELMO, J. E. M., DA SILVA, A. P. S. A., DA SILVA, A. G., ... & DOS SANTOS CORREIA, M. T. *Syagrus coronata* seed oils have antimicrobial action against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 23, p. 310-317, 2016.

SILVA LEITÃO, D. P., DA SILVA FILHO, A. A., POLIZELLO, A. C. M., BASTOS, J. K., & SPADARO, A. C. C. Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Bacchari sdracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 11, p. 1834-1839, 2004.

SILVA, F. B. D. **Potencial antimicrobiano da *Salvia officinalis* L. na Odontologia**. 2014.

SILVEIRA, C. S., PESSANHA, C. M., LOURENÇO, M. C. S., NEVES JÚNIOR, I., MENEZES, F. S., & KAPLAN, M. A. C. Antimicrobial activity of *Syagrus oleracea* and *Mauritiavivifera* fruits. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 143-148, 2005.

SOLANS, C., IZQUIERDO, P., NOLLA, J., AZEMAR, N., & GARCIA-CELMA, M. J. Nano-emulsions. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 10, n. 3, p. 102-110, 2005.

SOUSA, I. P. **Avaliação da atividade de óleos essenciais sobre micro-organismos bucais e efeito de formulação de exagatório bucal contendo óleo essencial sobre biofilme de micro-organismo cariogênio**. 2014. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

SUS - SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE, por Maciel Victor, 2016, Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/24205-uso-defitoterapicos-e-plantas-medicinais-cresce-no-sus>.

TABARELLI, M., & SILVA, J. M. C. D. Áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga. **Ecologia e conservação da Caatinga. Recife: Universidade Federal de Pernambuco**, p. 777-796, 2003.

TANOMARU FILHO, M., LEONARDO, M. R., SILVA, L. A. B., ANIBAL, F. F., & FACCIOLO, L. H. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. **International Endodontic Journal**, v. 35, n. 9, p. 735-739, 2002.

TEH, S. Y., LIN, R., HUNG, L. H., & LEE, A. P. Droplet microfluidics. **Lab on a Chip**, v. 8, n. 2, p. 198-220, 2008.

TORRES, C. R. G., KUBO, C. H., ANIDO, A. A., & RODRIGUES, J. R. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. **Brazilian Dental Science**, v. 3, n. 2, 2010.

TRAHAN, L. XYLITOL: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque--its clinical significance. **International dental journal**, v. 45, n. 1 Suppl 1, p. 77-92, 1995.

TROVÃO, D. M., FERNANDES, P. D., DE ANDRADE, L. A., & NETO, J. D. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 3, p. 307-311, 2007.

UHL, N.W.; DRANSFIELD, J. **Generum Palmarum. A classification of Palms based on the work of Harold E. Moore-Jr.** Lawrence, Kansas: Allen Press. 1987, 610p.

VON SÖHSTEN MARINHO, B.; SILVA ARAÚJO, A. C. Uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e biofilme dental/Use mouthwash in gingivitis and dental biofilm. **International Journal of Dentistry**, v. 6, n. 4, p. 124-131, 2008.

WHO - World Health Organization. Medicinal plants. Geneva: World Health Organization; 1978 [acesso 13 Junho 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/areas/traditional/wha3133.pdf>.

ZANATTA, F. B., & RÖSING, C. K. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. **Scientific-A**, v. 1, n. 2, p. 35-43, 2007.

ZANIN, S. M. W., MIGUEL, M. D., CHIMELLI, M. C., & OLIVEIRA, A. B. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. **Visão Acadêmica**, v. 3, n. 1, 2002.

APÊNDICES

Apêndice 1

Medicina Veterinária (UFRPE)

ISSN 1809-4678



Emulsão e microemulsão: novos sistemas de liberação controlada de fármacos no tratamento veterinário

[*Emulsion and microemulsion: new controlled release systems of veterinary drugs*]

"Revisão/Review"

SRL Basto^{1*}, JC Ferreira-Silva², FLA Silva¹, GAS Aleixo², TCM Stamford³,
MV Silva⁴, MTS Correia¹

¹Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil.

²Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, Brasil.

³Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil.

⁴Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil.

Resumo

A utilização de forma indiscriminada dos medicamentos veterinários não compromete apenas a eficiência, mas também elevam os custos dos tratamentos, independente da espécie animal. Diante da importância da indústria farmacêutica veterinária para a economia brasileira visando contribuir diretamente para manutenção da saúde e da produtividade animal, com essa revisão objetivou-se abordar sobre novos sistemas de liberação controlada de fármacos, especialmente as emulsões e microemulsões utilizadas no tratamento veterinário. As emulsões são misturas uniformes de pequenas partículas de uma substância num determinado fluido, no qual não é solúvel. Essas emulsões são dispersões coloidais formadas pelas fases dispersa e dispersante, além do agente emulsivo que contribui para estabilizar a emulsão. As microemulsões são sistemas homogêneos pouco viscosos e termodinamicamente estáveis. Apresentam dimensões variando entre a escala micrométrica e nanométrica, transparência ótica, capacidade de veicular fármacos hidrofílicos e lipofílicos, além de serem formadas facilmente pela mistura de seus componentes. Nos sistemas de liberação controlada de fármacos, mesmo utilizando pequenas quantidades de princípios ativos, ocorre uma otimização da ação do fármaco com consequente melhoria de sua biodisponibilidade e diminuição de sua toxicidade, além de facilitar sua administração. Finalizando, os sistemas de liberação controlada de fármacos, como as emulsões e as microemulsões, podem contribuir significativamente para a evolução da terapêutica veterinária por proporcionar o desenvolvimento de fármacos mais eficientes e atender as necessidades da indústria animal moderna.

Palavras-chave: animal, farmacologia, terapêutica.

Abstract

The indiscriminate use of veterinary medicine products compromises not only its efficiency, but also increases treatment costs regardless of animal species. Given the importance of veterinary pharmaceutical industry for Brazilian economy and with a view to contribute directly to maintenance of animal health and productivity, the objective of this review was to analyze new controlled drug release systems, especially emulsions and microemulsions, used for veterinary treatments. Emulsions are uniform mixtures of small particles contained in a particular fluid in which it is not soluble. Such emulsions are colloidal dispersions formed by dispersed and dispersing phases, in addition to the emulsifying agent which contributes to stabilize the emulsion. Microemulsions are homogeneous, non-viscous and thermodynamically stable systems. They exhibit dimensions varying between micrometric and nanometric scale, optical transparency, the ability to transport hydrophilic and lipophilic drugs, besides its ease to be obtained by mixing their components. In controlled drug delivery systems, even using small amounts of active principles, there is an optimized activity of the drug with consequent improvement of its bioavailability and decrease toxicity, thus facilitating its administration. Finally, controlled drug delivery systems, such as emulsions and microemulsions, may contribute significantly to evolution of veterinary therapy by providing more efficient drugs, which meets the needs of modern animal industry.

Key-words: animal, pharmacology, therapeutics.

*Autor para correspondência/Corresponding author: Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901. E-mail: biologist.sarah@gmail.com

Apêndice 2

Elsevier Editorial System(tm) for Arabian
Journal of Chemistry
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Pseudoternary phase diagram of licuri almond fixed oil (*Syagrus coronata*): development of microemulsion to formulation of an oral septic product

Article Type: Original Article

Keywords: Medicinal plants; licuri; *Syagrus coronata*; *C. elegans*; microemulsion

Corresponding Author: Ms. Sarah Basto,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Sarah Basto

Order of Authors: Sarah Basto; Fernanda Luizy Aguiar da Silva; José Carlos Ferreira-Silva; Flávia Juliana Lobato de França; Camila Alexandre de Luna; Giovanni Amadeu Paiva dos Santos; Thayza Christina Montenegro Stamford; Márcia Vanusa da Silva; Maria Tereza dos Santos Correia

Abstract: In Brazil the estimated value spent on phytotherapies is millions of dollars and with exponential growth, due to the change in society's behavior in search of the less synthesized products and with a "Green, Clean and Ethical" trajectory. *Syagrus coronata* popularly known as licuri, is a palm commonly found in dry and arid regions of the Caatinga and has great social and economic importance for the region. Recent studies have shown that the extracts or fractions of this plant have anti-Leishmania, antimicrobial and antioxidant properties in addition to potential for use as biodiesel and topical emulsion as a moisturizer. In this study a microemulsion of the licuri oil was formulated through the pseudoternary phase diagram and for the microemulsion the concentration of the fixed oil of licuri was around 40%, presenting stability for a period greater than 90 days, the microemulsion was tested for acute toxic and lethal activity against *C. elegans*, which at low concentrations were stable, but at concentrations higher than 27% at a time of exposure of 72h showed a toxicity between 6.41%, already in activity resistant *S. mutans* showed inhibitory activity among 10 μ L/mL. All activities evaluated had promising potential for licuri based products.

Apêndice 3



Natural Product Reports

ARTICLE

Mouthwash with licuri fixed oil (*Syagrus coronata*): characterization, checkerboard study with essential oil of mint, antibacterial activity, nematocide and HET-CAM

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

S. R. L. Basto¹, F. L. A. Silva¹, J. C. Ferreira-Silva², C. A. Luna³, G. A. P. Santos³, H. M. C. Andrade⁴, T. C. M. Stamford⁵, M. V. Silva⁵, M. T. S. Correia⁵

Oral mouthwashes are important resources in oral health maintenance, since it is able to provide the limitations of traditional mechanical hygiene because it reaches greater access to the bacteria of the dental biofilm. A great advantage of the use of medicinal plant oils as emulsions in products is the potentiation of a range of biological and organoleptic properties which they can confer on the formulations, in addition, such formulations promote an optimization of the delivery of the drug at the site of action, improving its bioavailability, reducing toxicity, facilitating administration, reducing the number of interventions and favoring the efficiency of treatments. In this study, a mouthwash based on licuri was developed. It was synergistic with the essential oil of mint, used as a flavoring agent. It showed bactericidal activity below 20 µg/mL for several bacteria that promote the genesis of oral biofilm as well as other oral conditions, low toxicity to *C. elegans* and as non-irritant by the coriolantoid membrane method, presenting with this great pharmacological potential, and its high importance at the scientific, technological and market level.

1 Introduction

Licuri (*Syagrus coronata*) is one of the most well-known native palm trees in Brazil and has great potential as an oleaginous (1). Predominantly of dry and arid regions of the Caatinga, presents / displays high socioeconomic value for diverse communities of the northeast, where this species is harnessed in its totality, being considered like fundamental provider of subsidies for the subsistence of the population of that region (Leal et al, 2005). The licurian oil is extracted from the almond present internally in the fruit of the licurizeiro, which is widely known for its nutritional value, where it contains nutrients such as copper, iron, manganese, zinc, calcium, magnesium and is rich in beta-carotene, already the almond contains iron, manganese and selenium (CREPALDI et al., 2001). These properties guarantee a good functioning of the nervous and immune system, prevention of osteoporosis and strengthening of bones, such as atherosclerosis, heart problems, rheumatoid arthritis, infections, hypoglycaemia, inflammation, lupus, etc. (ANJO, 2004; GELEUNSE, 1994; HITOSHI et al., 1995; MORAES & COLLA, 2006; KONOVAL et al., 2004). In addition to all these properties, the oil extracted from the licuri kernel can be used in the production of biodiesel, in the pharmaceutical industry and in the cosmetics industry. (LEAL et al., 2013). The sucrose and glucose derived from the diet are the main energy sources for *S. mutans*, through their metabolism leads to the formation of acidic compounds that promote the

reduction of pH in the biofilm (5.5), generating solubilization of hydroxyapatite, the main mineral constituent of dental enamel. This process causes the superficial demineralization of the tooth and bacterial spread on the damaged tissue, initiating the dental caries (LEITÃO et al., 2004).

The use of mouthwashes has become increasingly frequent as a particularly important resource for oral hygiene, mainly because it presents some advantages such as easy use, refreshment, palatability and access to bacteria even in areas of greater difficulty, thus integrating barriers to oral hygiene mechanics (ASADOORIAN, 2006). It is important to highlight the adjuvant benefits of mouthwashes, which are of great importance for children and the elderly, from whom, in general, they are less resourceful or unable to achieve adequate brushing.

Extracts and plant oils and their compounds isolated have shown antibacterial potential against several oral pathogens (AMBROSIO, S.R.; SCHORR, K.; DA COSTA, 2004; PORTO et al., 2009). A study carried out with mouthwashes containing oils extracted from plants showed efficiency in inhibiting the production of volatile sulfides by oral bacteria, which are the substances responsible for halitosis (BRITTO et al., 2009).

Many essential and fixed oils share anti-inflammatory and antioxidant effects (FDA, 2003; MIGUEL, 2010), properties that may associate therapeutic value with formulations. Thus, the advantages of using these oils in oral health products are the range of biological and organoleptic properties which they can additionally grant to the formulations to the use of active ingredients of organic origin in emulsion and microemulsion

¹Center of Biosciences, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil.

²Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco (FURPE), Recife-PE, Brazil.

³Departamento de Zoologia, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil.

⁴Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil.

⁵Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil.