

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NANOEMULSÃO CONTENDO O ÓLEO DE *Helichrysum gymnocephalum*

JOSIANE DIAS PIRES¹; ANDRESSA DE OLIVEIRA BLANKE HELLWI²;
CLÁUDIO M. P. de PEREIRA³; CLARISSA FRIZZO⁴; RODRIGO DE ALMEIDA
VAUCHER⁵; JANICE LUEHRING GIONGO⁶

¹Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção UFPel – josipel@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas - UFPel– Andressa-blanke@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - UFPel– claudiochemistry@gmail.com

⁴Universidade Federal de Santa Maria- UFSM- clarissa.frizzo@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - UFPel - rodvaucher@hotmail.com

⁶PPGBBIO - Universidade Federal de Pelotas/ Universidade Federal do Rio Grande -
janicegiongo@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A resistência aos antibióticos é um problema antigo e que persiste nos dias de hoje, principalmente no ambiente hospitalar. Ela acontece devido ao uso indevido e excessivo de antimicrobianos. Como consequência tem-se o agravamento de algumas doenças de ordem tóptica, respiratória, urinária entre outras, além do aumento no tempo de internação. Segundo a OMS ela é a causa de mais de 700 mil mortes ao ano no mundo, por isso deve ser enfrentada através da educação em saúde para população e também com políticas públicas.

As principais causas de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) incluem *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* e *Escherichia coli*. Esses microrganismos possuem fatores de virulência que favorecem o desenvolvimento de infecções crônicas ou persistentes (HOIBY et al., 2010).

Biocompostos estão sendo amplamente estudados, como alternativas aos fármacos convencionais. Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, com propriedades antibacterianas e antifúngicas. Por serem lipofílicos, conseguem atravessar a parede celular e se acumular na membrana citoplasmática bacteriana, aumentando sua permeabilidade ao romper diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios. O óleo de Immortelle (*Helichrysum gymnocephalum*) contém 1,8-cineol, monoterpenos e sesquiterpenos, compostos conhecidos por suas atividades antioxidantes e antimicrobianas (BAKKALI et al., 2008).

As nanoemulsões têm sido utilizadas para comprovar a atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos. Suas nanogotículas apresentam vantagens como tamanho reduzido e carga reduzida na membrana celular (GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2013). Esses sistemas oferecem vários benefícios como: direcionar fármacos e ativos para os locais específicos, reduzir os efeitos colaterais, liberar de forma controlada e melhorar a biodisponibilidade (SCHÄFER-KORTING, 2010). Além destes fatores, a utilização de nanoestruturas com óleos essenciais é vantajosa porque diminui sua volatilização e muitas vezes sua toxicidade.

Considerando que a nanotecnologia contribui para o desenvolvimento de novos biocompostos e que o Óleo de Imortelle possui ativos com atividade antimicrobiana, nosso grupo objetivou avaliar o óleo livre e nanoestruturado frente a cepas de microrganismos causadores de infecções importantes.

2. METODOLOGIA

2.1 Aquisição do óleo essencial Immortelle

O óleo Immortelle (*Helichrysum gymnocephalum* - OI) foi adquirido da empresa Terra Flor Aromaterapia, acompanhado do seu laudo técnico que descreve as análises de controle de qualidade do produto.

2.2 Caracterização do óleo essencial Immortelle

A caracterização do IO foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS) na Universidade Federal de Pelotas, pelo Laboratório de Inovação e Soluções em Química - INNOVASCHEM, utilizando o GC- Sistema MS QP2020 (Shimadzu®). As seguintes condições cromatográficas foram consideradas: coluna capilar, RTx-5MS (taxa de fluxo de gás de arraste de 30 m x 0,25 mm, 1,20 mL/min); gás de arraste, hélio; temperatura da coluna, inicialmente mantida a 40°C e aumentada gradualmente até 280°C (4 min de espera). Os espectros de massa foram registrados em uma faixa de varredura de 35-700 m/z. com base no tempo de retenção de GC e comparando os espectros de massa do composto de teste com aqueles disponíveis na biblioteca de espectros de massa.

2.3 Produção da nanoemulsão

A nanoemulsão com óleo de Immortelle (NEIO) foi preparada por meio da técnica de inversão de fase com baixa energia. A fase orgânica foi composta por surfactante, óleo de imortelle e acetona, enquanto a fase aquosa por surfactante e água, aquecida a 40°C. A fase orgânica foi adicionada lentamente à fase aquosa sob agitação, mantendo-se assim por 1 hora. A emulsão formada foi rotaevaporada, com controle de temperatura, para a remoção do solvente. Utilizando-se a mesma técnica, foi também produzida a nanoemulsão branca (NEB) e o óleo foi substituído por triglicerídeos de cadeia média (TCM). A NEB serviu como controle para os testes realizados.

2.4 Características físico-químicas das nanoemulsões

O diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta das amostras foram analisados utilizando equipamento Zetasizer Lab, Malvern Instruments. A análise é realizada usando espalhamento de luz de modo misto com análise de fase (M3-PALS). As amostras foram mantidas a temperatura de 25°C. As formulações foram diluídas 200 vezes, em água ultrapura, para posterior medição. As análises foram realizadas em triplicata (n=3). Os resultados indicados são a média dos resultados encontrados \pm desvio padrão. O experimento foi realizado no Núcleo de Análises e Pesquisas Orgânicas, da Universidade Federal de Santa Maria. O valor de pH das nanoemulsões foi determinado utilizando um potenciômetro previamente calibrado (MS TECNOPON mPa-210), e posteriormente as formulações foram armazenadas em recipientes hermeticamente fechados sob refrigeração.

2.5 Microrganismos

As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (NEWP 0053); *Staphylococcus aureus* (ATCC BA1026); *Staphylococcus aureus* (IC 1295962); *Klebsiella pneumoniae* (NEWP 0083); *Acinetobacter baumannii* (IC 38); *Candida albicans* (ATCC 14053); *Candida albicans* (IC 502) foram obtidas da bacterioteca do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos da UFPEL e foram cultivadas em placa de ágar nutriente, incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por um período de 18 a 24 horas antes do uso.

2.6 Atividade antimicrobiana - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (MBC)

A CIM foi determinada pela técnica de microdiluição em placas de 96 poços conforme método M7-A6 e M44-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), respectivamente. O composto foi preparado em um tubo estéril e armazenado a 4°C para minimizar a volatilização. A diluição seriada foi realizada a partir do primeiro poço até o décimo poço da placa. Após microdiluição seriada, 10µL do inóculo em escala McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foi adicionado a todos os poços e incubado a 37°C, por 24 horas. Um controle negativo contendo apenas o meio de cultura, e um controle positivo para crescimento microbiano contendo o meio de cultura e 10µL de o inóculo foi realizado. A CIM foi definida como a menor concentração do composto que inibiu crescimento microbiano e foi observado pela turbidez do meio de cultura nos poços da placa. A MBC das amostras foi determinada semeando 1µL do conteúdo do poço correspondente a MIC, o poço anterior e o seguinte, em ágar Mueller Hinton, semeado quantitativamente e incubado a 37°C, por 24 horas, para posterior quantificação das colônias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização mostrou que o cineol é o principal componente do óleo de Immortelle, representando 68,39%, resultado esse confirmado por Mollenbeck *et al.* (1997) que identificaram o cineol como o composto majoritário no OI com 66,7%.

Os resultados referentes a caracterização das nanoemulsões, estão descritos na Tabela 1.

Amostra	Tamanho (nm) \pm SD	PDI \pm SD	Potencial Zeta (mV)
NEIO	180 \pm 12,97	0,474 \pm 0,111	-35,74 \pm 0,853
NEB	220 \pm 11,20	0,888 \pm 0,148	-31,38 \pm 0,533

TABELA 1 - Valores de tamanho de partícula (nm), PDI e potencial zeta das nanoemulsões (média \pm desvio padrão)

Para o ensaio de pH, o valor encontrado foi de 4,7, valor que se manteve inalterado durante o período de avaliação, sendo o pH ácido atribuído à incorporação do óleo essencial, o que está de acordo com GIONGO *et al.*, 2016. Com base nos resultados para o PDI, verifica-se que o NEIO teve um PDI significativamente menor (0,474) e um tamanho de partícula de 180 nm. Este valor é considerado ideal para estabilidade, pois o movimento browniano produzido pelas gotas com tamanhos pequenos contribui para a estabilidade contra a sedimentação ou formação de cremes. Já para o potencial zeta os resultados encontrados foram próximos a -35,74 mV para o NEIO e 31,38 mV para o NEB, estes resultados indicam considerável estabilidade do sistema, uma vez que as partículas não possuem tendência a se aproximarem. Valores elevados de potencial zeta, \pm 30 mV, podem caracterizar formulações mais estáveis porque as partículas carregadas se afastam umas das outras.

Para a atividade antimicrobiana o óleo essencial pode ter apresentado forte ação antimicrobiana devido a presença de cineol em sua composição, Hendry *et al.* (2009). Este fato é confirmado por Mulyaningsiha *et al.* (2010), que testaram o cineol contra várias cepas de microrganismos gram-negativos, gram-positivo e leveduras com MICs variando de 8 a 64 mg/mL. Nossos resultados estão de acordo com os relatados na literatura, onde obtivemos MIC de 114,6 mg/mL para NEIO e 28,6 mg/mL para IO. Os resultados do OI e da NEIO se mostraram eficientes frente a *Pseudomonas aeruginosa* (NEWP 0053) e *Klebsiella pneumoniae* (NEWP 0083), como demonstrado na Tabela 2.

Microorganismos	IO		NEIO		NEB	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC BA 1026)	14,3	14,3	ND	ND	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> (IC 1295962)	28,6	57,3	ND	ND	ND	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NEWP 0053)	28,6	57,3	114,6	229,1	ND	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (NEWP 0083)	28,6	28,6	114,6	229,1	ND	ND
<i>Acinetobacter baumannii</i> (IC 38)	14,3	14,3	229,1	229,1	ND	ND
<i>Candida albicans</i> (ATCC 14053)	57,3	57,3	ND	ND	ND	ND
<i>Candida albicans</i> (IC 502)	57,3	114,6	ND	ND	ND	ND

ND: não detectado

TABELA 2 - Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) de IO, NEIO e NEB contra as cepas testadas

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que o óleo de Immortelle (*Helichrysum gymnocephalum*) é eficaz contra *Pseudomonas aeruginosa* (NEWP 0053) e *Klebsiella pneumoniae* (NEWP 0083), apresentando para as duas cepas, CIM e CBM de 28,6 e 57,3mg/mL para o óleo e 114,6 e 229,1mg/mL para a nanoemulsão, respectivamente. A nanoemulsão mostrou-se eficiente em relação a atividade antimicrobiana em cepas importantes causadoras de infecção.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—A review. **Food and Chemical Toxicology**, 2008, v. 46, p. 446–475.
- COMMISSION, EUROPEAN. Plano de ação contra a ameaça crescente da resistência antimicrobiana (2011). Brussels. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A52011DC0748>. Acesso em: 20 de agosto de 2023.
- GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20, p.338–344, 2013.
- HENDRY, E. R.; WORTHINGTON, T.; CONWAY, B. R.; LAMBERT, P. A. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. **J Antimicrob Chemother.**, 2009, v. 64, n. 6, p. 1219-25.
- HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 35, n. 4, p. 322-32, 2010.
- MOLLENBECK, S.; KÖNIG, T.; SCHREIER, P.; SCHWAB, W.; RAJAONARIVONY, J.; RANARIVELO, L. Chemical composition and enantiomer analysis of essential oils from Madagascar. **Flav. Frag. J.**, 1997, v. 12, p. 63–69.
- MULYANINGSIHA, S.; SPORERA, F.; ZIMMERMANN, S.; REICHLING, J.; WINKA, M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of Eucalyptus globulus against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **Phytomedicine**, 2010, v. 17, p. 1061-1066.
- SCHÄFER-KORTING, M. **Drug delivery**. Handbook of Experimental Pharmacology, Springer, 197, 2010.
- WEISS, J.; GAYSINKSY, S.; DAVIDSON, M.; MCCLEMENTS, J. Nanostructured encapsulation systems: food antimicrobials. **Global Issues in Food Science and Technology**, v.56, p.425-479, 2009.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance. 2018.