



Atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata contendo óleo essencial de melaleuca produzidas por síntese verde contra *Escherichia coli* e *Candida albicans*

Paola C.G.Oliveira (G)^{1,2}, Daphne F. Coppoli (PG)¹, Ana C. M. Apolônio (PQ)², Francis M. Borges (PQ)², Antonio C. Sant'Ana (PQ)¹

¹ Laboratório de Nanoestruturas Plasmônicas, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFJF, Juiz de Fora, Minas Gerais

² Departamento de Parasitologia, Imunologia e Microbiologia, UFJF, Juiz de Fora, Minas Gerais

*e-mail do autor correspondente: paolacunha.gomes@estudante.ufjf.br

RESUMO

RESUMO

Com o aumento da resistência antimicrobiana (1), a busca por novas estratégias para combatê-la se tornou urgente. Assim, nanopartículas de prata (AgNPs) surgem como uma aliada pois apresentam propriedades antimicrobianas únicas relacionadas à sua área de superfície, levando à uma maior interação com as membranas dos microrganismos (2). Uma das técnicas para sintetizá-las é através de síntese verde utilizando óleos essenciais, os quais atuarão como agentes redutores da Ag^+ (2). O óleo de melaleuca (OEM) apresenta propriedades contra bactérias e fungos devido ao seu constituinte majoritário, o terpinen-4-ol (3). Objetivou-se verificar a atividade antimicrobiana das AgNPs contendo OEM e determinar se constituem-se como uma alternativa aos tratamentos convencionais, contra bactérias e fungos, *in vitro*. Os ensaios de halo de inibição realizados com *Escherichia coli* foram satisfatórios, mas menos efetivos com *Candida albicans*, sendo uma possível opção aos tratamentos usuais contra bactérias.

Palavras-chave: resistência antimicrobiana, nanopartículas de prata, síntese verde, óleo essencial de melaleuca

Introdução

A resistência antimicrobiana (RAM) vem ganhando cada vez mais destaque na mídia e se tornando uma preocupação crescente para as autoridades mundiais. De acordo com relatório da Organização Mundial da Saúde, publicado em 2022, até 2050 a resistência bacteriana poderá estar associada a 10 milhões de mortes anuais (1). À respeito dos fungos, a resistência às quatro classes dos antifúngicos disponíveis tem se tornado mais frequente, afetando principalmente pacientes em estado grave de saúde e aqueles com o sistema imune comprometido (2). Assim, a busca por novas estratégias para combater a RAM se tornou não apenas necessária, mas urgente. Nesse viés, a utilização da nanotecnologia surge como aliada a esse processo visto que as nanopartículas, especialmente as de prata (AgNP), apresentam propriedades antimicrobianas únicas devido à sua grande área de superfície, levando à uma maior interação com as membranas dos microrganismos (3). Uma das técnicas para se produzir AgNPs é através de síntese verde utilizando óleos essenciais, os quais atuarão como agentes redutores da Ag^+ , sendo este processo mais limpo, não danoso ao meio ambiente além de ser mais aceito na terapêutica (3). O óleo essencial de melaleuca (OEM), muito empregado no tratamento de infecções da pele, possui ação tanto contra bactérias Gram-Positivas quanto Gram-Negativas, sendo essa atividade devido ao seu constituinte majoritário, o terpinen-4-ol (4). Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana das AgNPs contendo o óleo essencial de melaleuca e determinar se constituem-se como uma alternativa para os tratamentos convencionais, contra bactérias e fungos, *in vitro*.

Experimental

Síntese das nanopartículas de prata (AgNPs)

Adicionou-se, em um erlenmeyer, 5 mL de óleo essencial de melaleuca e 8 mg de $AgNO_3$ e levou-se para agitação e aquecimento a 95°C por 4 horas. Após 24 horas, observou-se a mudança de coloração para amarelo bem claro. Para verificar a formação das nanopartículas, diluiu-se as amostras (OEM e Síntese Verde) com etanol (990µL de etanol e 10µL da amostra) e realizou-se a análise por espectroscopia UV-VIS.

Atividade antimicrobiana

Preparou-se, a partir de um repique fresco em ágar, soluções salinas de *Escherichia coli* e *Candida albicans* com turbidez de 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL para bactérias e $1,5 \times 10^6$ para fungos). Utilizando-se o método de *spread plate* (onde injeta-se a amostra sobre o meio de cultura já solidificado), inoculou-se os microrganismos no meio de cultura (ágar Brain Heart Infusion para *E.coli* e ágar Sabouraud dextrose para *C.albicans*) usando um swab estéril e espalhou-os pela placa de petri. Posteriormente, realizou-se a montagem de poços com 6 mm de diâmetro, no ágar, com o auxílio de uma ponteira de 200 µL para que, desse modo, o tamanho da área ocupada pelas amostras fosse similar aos discos dos controles (antibióticos e antifúngicos). Assim, inoculou-se o controle e 50µL de cada amostra (óleo essencial de melaleuca, síntese verde e síntese convencional) nos seus respectivos poços e incubou-se as placas em uma estufa. Após 24h, para *E.coli*, e 48h, para *C.albicans*, realizou-se a leitura dos halos de inibição.



Teste de atividade antimicrobiana dos compostos voláteis do óleo

Este teste foi realizado com o intuito de avaliação da manutenção dos compostos voláteis responsáveis pela atividade antimicrobiana. Utilizou-se tubos Eppendorf com tampa preenchida com ágar BHI, inoculado com *E.coli*. Foram feitos tubos de controle negativo (óleo de girassol), controle positivo (OEM) e o tubo com a síntese verde. Após a inoculação das amostras, incubou-os em uma estufa e analisou-se os resultados após 24h.

Resultados e Discussão

Após a realização da síntese, utilizou-se a espectroscopia UV-VIS a fim de verificar a formação das AgNPs. O espectro da figura 1, demonstra que houve uma mudança no perfil da banda, quando compara-se com o óleo essencial puro, indicando, assim, a perda de constituintes voláteis durante a síntese. Entretanto, o teste de atividade antimicrobiana dos compostos voláteis do óleo indicou que, apesar da perda, o efeito antibacteriano das substâncias voláteis do óleo da melaleuca foi mantido. Além disso, o aumento de intensidade acima de 300 nm indica a formação de nanopartículas muito pequenas. Assim, prosseguiu-se para os testes biológicos onde os ensaios de halo de inibição de crescimento realizados com *Escherichia coli* demonstraram que a síntese verde apresentou um halo superior à síntese convencional, ao OEM puro e até mesmo aos antibióticos escolhidos como controle, conforme demonstrado no quadro 1, sendo os perfis de susceptibilidade determinados de acordo com o *Breakpoint tablets for interpretation of MIC's and zone diameters of The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (5). No trabalho desenvolvido por Lila *et al.*(2024), os autores desenvolveram uma síntese verde com o OEM e ela também apresentou capacidade antimicrobiana superior ao próprio óleo essencial, apesar de os halos de inibição serem diferentes (6). Com relação à *Candida albicans*, apresentado no quadro 1, o efeito antifúngico foi sutil quando comparada com a anfotericina B (controle), mas superior ao óleo essencial puro e da síntese convencional, sugerindo atividade sinérgica entre a prata e o óleo, sendo, então, algo promissor e evidenciando que, ao modificar alguns parâmetros na síntese (como a temperatura ou o tempo), pode-se, provavelmente, melhorar essa ação antifúngica.

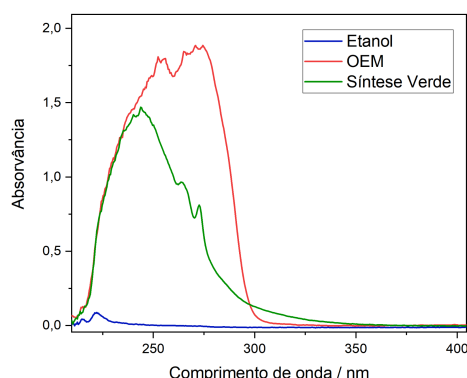


Figura 1. Espectro UV-VIS da síntese verde, etanol e óleo essencial de melaleuca.

Quadro 1. Halos de inibição e perfil de sensibilidade das substâncias testadas frente aos microrganismos (MO) *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

MO	Substância	Halo de inibição (mm)	Susceptibilidade*
<i>Escherichia coli</i>	OEM	21	-
	AgNP + OEM (SV)	27	-
	AgNP + OEM (SC)	18	-
	Piperacilina/Tazobactam	24	S
	Ceftriaxona	20	R
	Ceftazidima	12	R
	Penicilina G	0	R
	Clindamicina	0	R
<i>Candida albicans</i>	OEM	0	-
	AgNP + OEM (SV)	15	-
	AgNP + OEM (SC)	14	-
	Anfotericina B	21	S

*R=Resistente, S=Suscetível e - = Não se aplica (5)

Conclusões

Através da metodologia de síntese verde, foi possível sintetizar AgNPs a partir do óleo essencial de melaleuca e verificar sua ação contra a *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Assim, a partir dos resultados obtidos, percebe-se que houve um sinergismo entre as atividades antimicrobianas das AgNPs e do óleo essencial de melaleuca em ambos os casos, obtendo um maior destaque para sua atividade antibacteriana, constituindo-se, assim, como uma possível alternativa aos tratamentos convencionais contra bactérias. Ademais, foi observado a perda de compostos voláteis durante o processo e, desse modo, a otimização da síntese é necessária (a fim de evitar isso) e está em curso.

Agradecimentos

Agradecimentos às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG e à Universidade Federal de Juiz de Fora.

Referências

- (1) Anvisa. **Resistência antimicrobiana é ameaça global, diz OMS**, 2022.
- (2) Fiocruz. **OMS divulga a primeira lista de fungos que ameaçam a saúde. Rede internacional de educação em técnicos em saúde**, 2022.
- (3) A. Kshirsagar *et.al.* **J. Nanosc. Nanotechnol.**, 18, 2018.
- (4)E.C. Savani *et. al.* **Infarma S.1**, 33, 2021.
- (5) EUCAST. **Breakpoint tablets for interpretation of MIC's and zone diameters**. 15.0, 2025.
- (6) A.S.A Lila *et al.* **Nano Express**, 5, 2024.