

15º Congresso Brasileiro de Polímeros
27 a 31 de outubro de 2019

ESTUDO DA PROPRIEDADE ANTIBACTERIANA E DA INCOPORAÇÃO DO ÓLEO DE MELALEUCA EM ARGILA MONTMORILONITA

Márcia C. Branciforti^{1*}, Larissa B. Proença¹, Carlos A. P. Pena¹, Francisco V. Santos¹, Geovana V. da Silva² e Ilana L. B. C. Camargo²

1 – Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, SP

**marciacb@sc.usp.br*

2 – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, SP

Resumo: A presença de microorganismos em feridas da pele pode acarretar em infecções que dificultam o processo de cicatrização. Quando bactérias multirresistentes infectam o ambiente da lesão, o tratamento é ainda mais complicado. Com o objetivo de investigar novos agentes antimicrobianos capazes de eliminar microorganismos multirresistentes, o óleo de melaleuca foi avaliado quanto às suas propriedades antibacterianas. A argila montmorilonita (MMT) foi escolhida para constituir um bionanocompósito de polímero-argila para aplicação em curativos. A MMT é interessante para este uso uma vez que retém e promove uma liberação controlada do composto ativo no local da ferida. O teste de disco difusão foi feito para avaliar as propriedades antimicrobianas do óleo essencial de melaleuca. Ensaios de difratometria de raios-X (DRX) foram realizados a fim de observar se houve a incorporação do óleo natural e do glicerol entre as estruturas lamelares da MMT. O óleo de melaleuca apresentou propriedades antibacterianas quando testado com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, formando halos de inibição de 16 e 18 mm, respectivamente. Quanto aos resultados de DRX, estes revelaram que o óleo de melaleuca e o glicerol foram incorporados com sucesso na estrutura da argila visto que ocorreu o aumento da distância interlamelar do pico característico $d_{(001)}$ da MMT, indicando, portanto, a presença dos compostos orgânicos.

Palavras-chave: antibacteriano, óleo essencial, nanoargila, esfoliação, curativo.

Studying antibacterial properties of Tea tree oil and its incorporation in montmorillonite clay

Abstract: The presence of microorganisms in skin wounds can lead to infections that hinder the healing process. When multidrug-resistant bacteria infect the lesion environment, the treatment is even more complicated. In order to investigate new antimicrobial agents able to eliminate multidrug-resistant microorganisms, antibacterial property of the tea tree oil was evaluated. The montmorillonite clay (MMT) was chosen to constitute a polymer-clay bionanocomposite for application in wound healing. The MMT is interesting for this use once it retains and promotes a controlled release of the active compound into the wound. The evaluation of the antimicrobial properties of tea tree essential oil was performed by disk-diffusion test. The possible incorporation of the natural oil and glycerol into the lamellar structures of MMT were observed by X-ray diffraction (XRD). Tea tree essential oil was active against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, creating zones of inhibition of 16 and 18 mm, respectively. According to XRD results, the tea tree oil and glycerol were successfully incorporated into the clay structure once MMT characteristic peak $d_{(001)}$ dislocated for minor angles, indicating the increase of interlamellar distance and so, the presence of organic compounds.

Keywords: antibacterial, essential oil, nanoclays, exfoliation, wound dressing.

Introdução

As feridas na pele podem ser causadas por queimaduras, cortes, incisões cirúrgicas ou mesmo geradas por algum tipo de doença. Essas lesões levam a perda da função protetora da pele contra os

microrganismos externos, propiciando um ambiente favorável para a colonização e crescimento de bactérias [1,2]. O microrganismo mais comum em feridas é o *Staphylococcus aureus*; porém grande parte dos casos a infecção tende a ser polimicrobiana, com a presença de bactérias do tipo *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* ou *Pseudomonas aeruginosa* [3].

O desenvolvimento de curativos antimicrobianos a base de polímeros surgiu da necessidade de evitar a contaminação da ferida por microorganismos [2]. Devido ao ritmo acelerado de surgimento de bactérias multiresistentes, diversas alternativas terapêuticas, agentes antimicrobianos, como óleos essenciais, e polímeros têm sido investigados a fim de melhorar a eficiência desse tipo de cobertura [4].

Óleos essenciais são interessantes para aplicação em curativos antimicrobianos uma vez que apresentam uma mistura complexa de diversos componentes. Essa característica dos óleos naturais propicia uma melhor eliminação de bactérias resistentes do que os antibióticos, compostos de apenas uma entidade molecular [5]. O óleo de melaleuca apresenta diversas propriedades antibacteriana, antiviral e anti-inflamatória. Além disso, estudos mostram uma boa eficiência do óleo contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, bacilos ácidos resistentes, leveduras e fungos; fato que tem permitido empregá-lo em antissépticos para a pele [6,7].

O avanço da nanomedicina e da nanotecnologia tem possibilitado a criação de curativos que entregam fatores de crescimento, terapias celulares, terapias genéticas e agentes antimicrobianos que estimulam a cicatrização [8]. A montmorilonita (MMT) é uma nanoargila bastante investigada como carregadora de compostos ativos. Apresenta uma estrutura cristalina formada por duas camadas tetraédricas de Si-O e uma camada octaédrica central de óxido Al-O que, combinadas, constituem uma lamela [9,10].

A distância basal entre as lamelas é suficiente para acomodar diferentes compostos orgânicos na estrutura da argila, permitindo a formação de nanocompósitos ou incorporação de drogas [11]. Esse espaçamento interlamelar determina o grau de esfoliação da argila e o nível de interação molecular entre o composto inorgânico e a matriz polimérica [12].

As argilas minerais têm sido utilizadas como portadores de fármacos que podem ser adsorvidos e liberados em locais alvos do corpo humano, permitindo uma entrega controlada de compostos ativos [13]. Ainda no campo biomédico, a MMT é aplicada em produtos que visam à proteção e limpeza de pele, adsorção de bactérias (*E. coli* e *S. aureus*), imobilização de toxinas celulares, atividade antibacteriana e cicatrização e coagulação do sangue sem causar efeitos colaterais [14].

A pesquisa objetiva o desenvolvimento de filmes biopoliméricos de poli(ácido láctico) incorporados com MMT e óleo essencial de melaleuca, que podem ser utilizados em aplicações biomédicas, como curativos, ou mesmo em embalagens devido a combinação de propriedades biocompatível e antimicrobiana desse material. Nesse trabalho serão apresentados os resultados iniciais da pesquisa que compreendem a metodologia usada para a incorporação do óleo na MMT, a caracterização da incorporação e a avaliação da propriedade antibacteriana do óleo essencial utilizado.

Experimental

Ensaio antibacteriano

O método de disco-difusão foi realizado para avaliar a suscetibilidade de certos microorganismos ao óleo essencial de melaleuca adquirido da empresa Amazon, Brasil. *Escherichia coli* ATCC25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC29213 foram cultivadas em caldo BHI por 18h a 35°C e, em seguida, um pré-inóculo foi ajustado na escala 0.5 de MacFarland em solução salina a 0,9% e semeado sobre

o meio de cultura Agar Müeller Hintonem placa de Petri. Uma alíquota de 7 µL do óleo essencial de melaleuca foi adicionado em discos de papéis previamente esterilizados e colocados sobre o meio de cultura semeado com a bactéria. As placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C e, em seguida, a possível presença de halo de inibição foi observada e medida com régua milimetrada. Os ensaios foram realizados em duplicatas independentes.

Incorporação do óleo essencial de Melaleuca na argila MMT

A incorporação do óleo essencial na argila (Cloisite 20^a, Southern Clay Products) foi feita utilizando o ultrassom de ponteira Hielscher UP400S, potência 400W, frequência de 20 KHz. Inicialmente, uma solução foi preparada com argila, óleo essencial na proporção de 1:1, agente surfactante (Tween 80, Synth) nas proporções de 0,25g/g de óleo essencial e 50 ml de água. Outras três amostras foram feitas nessas mesmas condições, acrescentando o glicerol, na proporção 1:3 de MMT:glicerol, a fim de avaliar o efeito desse componente na esfoliação da argila. A mistura foi homogeneizada por 1 minuto com o Ultra-Turrax T25 IKA Labortechnik na velocidade de 19.000 rpm. Em seguida, a irradiação ultrassônica foi realizada por 30 minutos, com a sonda imersa na solução. Durante esse período, o recipiente contendo a solução foi mantido em agitação magnética, sendo resfriado continuamente a fim de manter a temperatura próxima a do ambiente. Posteriormente, as amostras foram secas a 110° C durante 24 horas.

Difratometria de Raio-X

A técnica de difração de raio-X foi utilizada para avaliar a incorporação de óleo essencial e glicerol entre as lamelas da argila. O ensaio foi realizado no difratômetro da marca Rigaku, modelo Ultima IV, utilizando tubo selado de Cu ($\lambda_{Cu - K\alpha} = 1,5405 \text{ \AA}$), velocidade de varredura de 1°/min, no intervalo de 1,5°- 40° em passos de 0,02°/s, a 40 kV e 40 A.

Resultados e Discussão

Os resultados do ensaio antibacteriano estão apresentados na Fig. 1 e 2. Após o período de incubação de 24 horas, observa-se na placa com *E. coli*, Fig.1, a formação de um halo de inibição de 16 mm no disco que contém apenas o óleo de melaleuca (destacado pelo círculo). Na placa com *S. aureus*, Fig.2, o disco com o óleo teve halo de inibição de 18 mm. Esses resultados mostram que as bactérias analisadas apresentam suscetibilidade ao óleo de melaleuca de forma similar. Após a repetição dos testes, esse fato se confirma uma vez que os discos continuaram a formar halos inibitórios de 15 mm em ambas as bactérias.

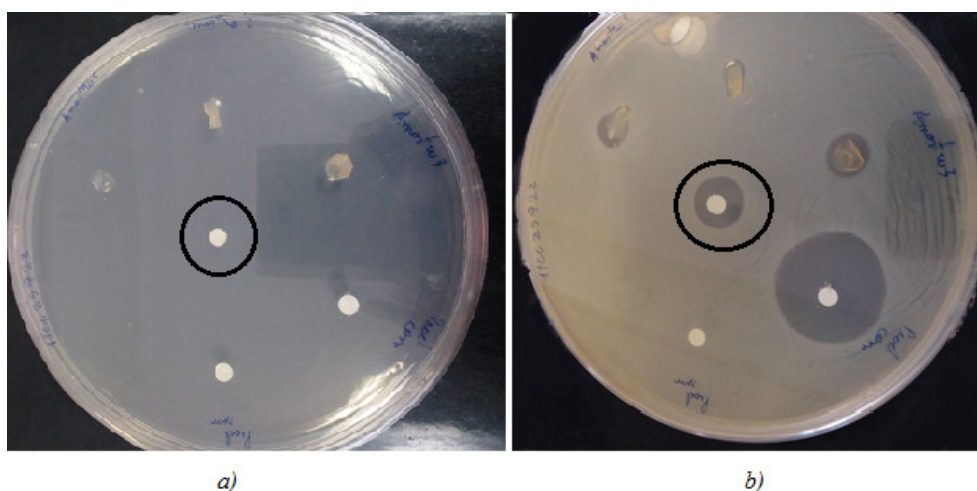


Figura 1 – Teste de disco-difusão com óleo de melaleuca em *E. coli* ATCC25922 a) antes e b) após incubação de 24 horas.

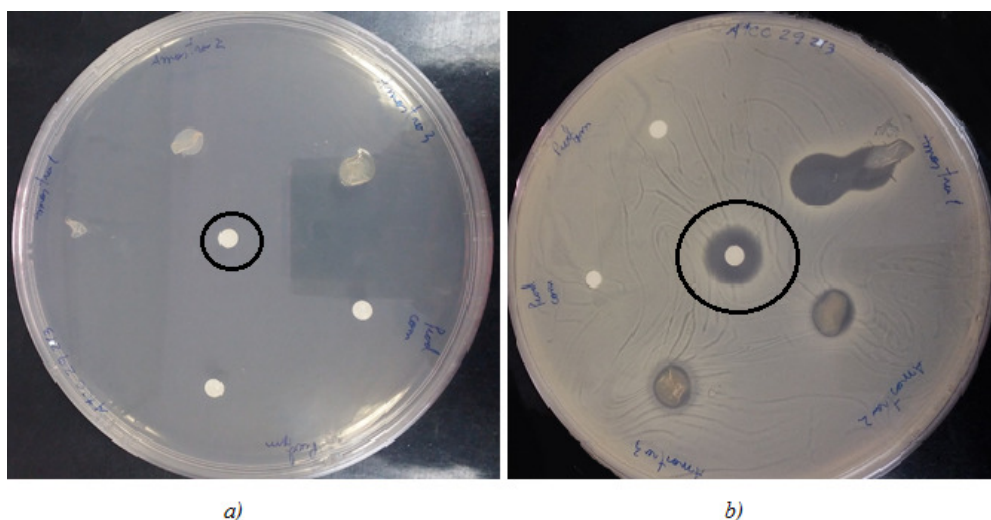


Figura 2 – Teste de disco-difusão com óleo de melaleuca em *S. aureus* ATCC29213 a) antes e b) após incubação de 24 horas.

A técnica de difração de raio-X possibilitou avaliar o processo de esfoliação da argila através do aumento da distância interlamelar. Analisando a Fig.3, percebe-se que a argila original apresenta um pico de difração em 2θ igual a $3,49^\circ$, correspondente a distância interlamelar de 2,52 nm, característico da MMT Cloisite 20A. Quando as amostras são submetidas ao processo de ultrassom, nota-se a diminuição do ângulo 2θ para valores menores. Este fato deve-se à incorporação dos componentes orgânicos, óleo essencial (OE) e glicerol, entre as camadas de argila. A presença do óleo levou ao aumento da distância interlamelar para 3,52nm, enquanto que na amostra com apenas glicerol, a distância interlamelar foi de 3,06 nm. Assim, conclui-se que o óleo puro promove melhores resultados de esfoliação que o glicerol. Porém, a combinação desses dois componentes acarreta em um maior deslocamento do pico do plano $d_{(001)}$, ampliando a distância interlamelar para 4,24nm, indicando que a mistura de OE e glicerol é interessante para promover uma melhor esfoliação da argila.

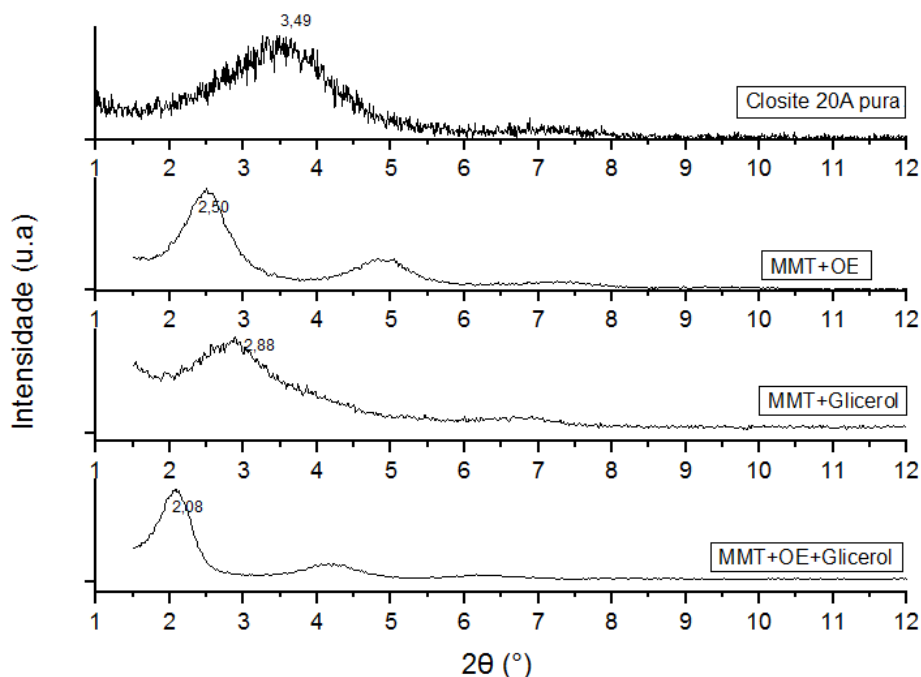


Figura 3 – Difratomogramas de raio-X da argila pura (MMT) e esfoliada com óleo de melaleuca (OE) e glicerol.

Conclusões

Os resultados obtidos revelaram que o óleo de melaleuca apresenta propriedades antibacterianas contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, as quais são comuns em infecções de feridas. O método de incorporação desse composto ativo e do glicerol na estrutura da argila montmorilonita mostrou-se bem sucedido uma vez que as análises de DRX apresentaram distâncias interlamelares do plano $d_{(001)}$ maiores do que as amostras de MMT pura. Portanto, estes resultados iniciais indicam que a MMT pode incorporar o óleo de melaleuca apresentando potencial para futuro uso em curativos para tratamentos de feridas causadas por essas bactérias.

Agradecimentos

À CAPES pelo auxílio financeiro, código de financiamento 001. À FAPESP pelo auxílio financeiro processos 2017/26194-7 e 2019/16450-1. Ao IFSC e IQSC, em especial ao Prof. S. P. Campana Filho, por possibilitarem a realização de ensaios fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho.

Referências

1. Z. Li; M. Knetsch, *Current Pharmaceutical Design*. 2018, 24, 936.
2. D. Simões; S. Miguel; M. Ribeiro; et al. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018, 127, 130.
3. F. Aubert-Viard; A. Mogrovejo-Valdivia; N. Tabary; et al. *Materials Science & Engineering C*. 2019, 100, 554.
4. D. C. Mirante, Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2015.
5. F. Solórzano-Santos; M. G. Miranda-Novales. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012, 23, 136.
6. R. Zeng, C. Lin, Z. Lin et al. *Cell and Tissue Research*. 2018, 374, 217.
7. C. F. Carson, T. V. Riley, B. D. Cooksont. *Journal of Hospital Infection*. 1998, 40, 175.
8. M. M. Jahromi; P. S. Zangabad; et al. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018, 123, 33.
9. F. Tornuk; O. Sagdic; M. Hancer; et al. *Food Research International*. 2018, 107, 337.
10. S. Jayrajsinh; G. Shankar; Y. Agrawal et al. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2017, 39, 200.
11. E. Alexandre; R. Lourenço; A. Bittante et al. *Food Packaging and Shelf Life*. 2016, 10, 87.
12. D. Chaudhary, H. Liu. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013, 20, 63.
13. J. Moraes, S. Bertolino, S. Cuffini et al. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017, 534, 213.
14. R. Mishra, K. Ramasamy, S. Lim et al. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2014, 25, 1925.