

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÓLEO DE AÇAÍ

Júlia Kubaszewski Nunes¹; Thuany Lura Teixeira Bandeira²; Luana Rosa Da Silva³; Ticiane Da Rosa Pinheiro⁴; Roberto Christ Viana Santos⁵; André Gundel⁶; Alencar Kolinski Machado⁷; Aline Ferreira Ourique⁸

RESUMO

O óleo de *Euterpe oleracea* Mart apresenta baixa solubilidade aquosa, o que dificulta sua administração e absorção. O estudo teve como objetivo preparar, caracterizar, avaliar a estabilidade e a atividade antimicrobiana de nanoemulsões contendo óleo de açaí. As nanoemulsões foram preparadas por emulsificação sob alta agitação e emulsificação espontânea. As formulações foram caracterizadas quanto a tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão (IPD), potencial zeta (PZ) e pH, armazenadas em diferentes condições. A atividade antimicrobiana do óleo livre foi realizada pelo método de disco difusão. O potencial antimicrobiano do óleo livre e nanoemulsionado foi avaliado através do método de diluição em caldo. Foi possível constatar que as características físico-químicas das nanoemulsões foram adequadas. O óleo de açaí livre e nanoemulsionado não demonstrou atividade antimicrobiana significativa, fato que pode estar relacionado com a composição do óleo empregado a qual sofre influência de vários fatores como época da colheita e condições climáticas.

Palavras-chave: Ácidos graxos; Antibióticos; Espécies bacterianas; *Euterpe oleracea* Mart.

ABSTRACT

Euterpe oleracea Mart oil has low aqueous solubility, which makes it difficult to administer and absorb. The aim of this study was to prepare, characterize and evaluate the stability and antimicrobial activity of nanoemulsions containing açai oil. The nanoemulsions were prepared by emulsification under high agitation and spontaneous emulsification. The formulations were characterized in terms of average droplet size, polydispersity index (DPI), zeta potential (ZP) and pH, stored under different conditions. The antimicrobial activity of the free oil was measured using the disk diffusion method. The antimicrobial potential of the free and nanoemulsified oil was assessed using the broth dilution method. It was found that the physicochemical

¹ Júlia Kubaszewski Nunes: Universidade Franciscana (UFN); julia.knunes@ufn.edu.br

² Thuany Lura Teixeira Bandeira: Universidade Franciscana (UFN); thuany.bandeira@ufn.edu.br

³ Luana Rosa Da Silva: Universidade Franciscana (UFN); rosa.luana@ufn.edu.br

⁴ Ticiane Da Rosa Pinheiro: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM); ticianerp@yahoo.com.br

⁵ Roberto Christ Viana Santos: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM); robertochrist@gmail.com

⁶ André Gundel: Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA); gundel@gmail.com

⁷ Alencar Kolinski Machado: Universidade Franciscana (UFN); alencar.machado@ufn.edu.br

⁸ Aline Ferreira Ourique: Universidade Franciscana (UFN); aline.ourique@ufn.edu.br

characteristics of the nanoemulsions were adequate. The free and nanoemulsified açai oil did not show significant antimicrobial activity, a fact that may be related to the composition of the oil used, which is influenced by various factors such as the time of harvest and climatic conditions.

Keywords: Fatty acids; Antibiotics; Bacterial species; *Euterpe oleracea* Mart.

Eixo Temático: Atenção Integral e Promoção à Saúde (AIPS)

1. INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana é um problema crescente a nível mundial (Rasheed et al., 2014). A busca por novos agentes antimicrobianos de origem natural tem se mostrado uma alternativa promissora para tentar propor novas opções terapêuticas e combater este desafio (Newman; Cragg, 2012). Nesse sentido, a floresta Amazônica localizada na região norte do Brasil, possui uma grande variedade de espécies vegetais, os quais tem sido estudados como possíveis fontes de novos bioativos.

O açai é uma fruta nativa da região amazônica, que ganhou importância devido aos benefícios à saúde, capacidade anti-inflamatória (Menezes; Torres; Srur, 2008) e antioxidante, em razão da existência de polifenóis, flavonoides e antocianinas, além de ser rico em ácidos graxos como o ácido linoleico, ácido oleico e ácido palmítico (Castro et al., 2021). Ademais, estudos têm demonstrado que o óleo da semente de açai apresenta atividade antimicrobiana contra diferentes espécies bacterianas (Araújo et al., 2013). No entanto, existe algumas limitações que dificultam a sua utilização, como a baixa solubilidade em soluções aquosas e instabilidade frente a diferentes condições.

Nesse cenário, a nanotecnologia pode ser empregada para superar estes desafios, além de poder controlar a liberação de bioativos, aumentar a biodisponibilidade, biocompatibilidade e proteção contra a degradação física e química, induzindo assim um aumento da ação farmacológica e proteção contra a toxicidade (Saraf, 2010).

Dentre os nanossistemas, as nanoemulsões demonstram boa eficiência como carregadores de óleos vegetais e essenciais, proporcionando a formação de

gotículas na faixa de 50 a 500 nm, apresentando aparência translúcida quando o tamanho dos glóbulos for inferior a 100 nm e aparência leitosa para diâmetros maiores (Fernandez *et al.*, 2004). As nanoformulações do tipo óleo/água permitem o encapsulamento de componentes lipofílicos a serem usados em meios aquosos, e podem melhorar a entrega aos sítios a serem tratados e reduzir possíveis efeitos tóxicos (Primo *et al.*, 2007). Portanto, este estudo experimental teve como objetivo preparar, caracterizar, avaliar a estabilidade e a atividade antimicrobiana de nanoemulsões contendo óleo de açaí.

2. METODOLOGIA

2.1 PREPARAÇÃO DAS NANOEMULSÕES CONTENDO ÓLEO DE AÇAÍ

A cromatografia gasosa determinou os ácidos graxos presentes no óleo com o auxílio de um cromatógrafo equipado com um sistema de ionização por chama detector (GC – FID) (Varian, Star, 3600, EUA) e um amostrador automático (Varian, 8100, EUA). Os resultados foram expressos como porcentagem da área total dos cromatogramas, considerando a correção dos fatores do detector de ionização de chama (Visentainer, 2012).

As nanoemulsões foram preparadas por dois métodos: emulsificação sob alta agitação empregando equipamento Ultra-Turrax® com resfriamento. Neste método não foi empregado solvente orgânico. A fase oleosa da nanoemulsão foi composta por óleo de *Euterpe oleracea* Mart (5%) e monooleato de sorbitano (2%), enquanto a fase aquosa compreendeu polissorbato 80 (2%) e 25 mL de água ultrapura. Ambas as fases foram previamente solubilizadas com o auxílio de um agitador magnético e, em seguida, injetou-se a fase oleosa na fase aquosa sob agitação de 10.000 rpm. Após a injeção, a agitação foi aumentada para 17.000 rpm e mantida por 1 hora.

Já o segundo método, de baixa energia, através da emulsificação espontânea, fez uso de solvente orgânico, e possibilita a obtenção de gotículas estáveis com pouca quantidade de tensoativo. A fase oleosa da nanoemulsão foi composta por óleo de *Euterpe oleracea* Mart (1,6%), monooleato de sorbitano (0,8%) e 67 mL de acetona, enquanto a fase aquosa compreendeu polissorbato 80 (0,8%) e 134 mL de água ultrapura. Ambas as fases foram previamente

solubilizadas com o auxílio de um agitador magnético e, em seguida, verteu-se a fase oleosa na fase aquosa, e o nanossistema foi levado ao rotaevaporador para evaporação completa do solvente orgânico e ajuste do volume final para 25 mL. Todas as formulações foram produzidas em triplicata.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

Após o preparo, todas as formulações foram caracterizadas pelos seguintes parâmetros: tamanho médio de gotícula, índice de polidispersividade, potencial zeta, pH e morfologia.

A técnica de espalhamento dinâmico de luz utilizou o equipamento Nano-ZS Zetasizer e determinou tamanho médio das gotículas e o índice de polidispersividade (PDI). Amostras foram diluídas água Milli-Q e os resultados foram determinados a partir da média de três repetições. O potencial Zeta das formulações foi obtido por microeletroforese utilizando o equipamento Zetasizer Nano-ZS, expressando os resultados em milivolts. As análises foram realizadas após diluição das formulações em solução aquosa contendo NaCl 10 mM previamente filtrada através da membrana de 0,45 µm. Os resultados foram obtidos a partir da média de três determinações. O pH foi medido diretamente nas formulações com o auxílio de um potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

Para a análise morfológica das nanoemulsões utilizou-se a técnica de Microscopia de Força Atômica (MFA), utilizando o equipamento Agilent Technologies 5500. As imagens foram capturadas usando o software PicoView 1.14.4 (Molecular Imaging Corporation) e analisadas através do PicoImage 5.

2.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE

A estabilidade das formulações foi avaliada mediante o acompanhamento das formulações armazenadas em diferentes condições: 25°C, 4°C e câmara climática a 40°C e 65% de umidade. Nos tempos 0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias avaliou-se os parâmetros de: tamanho, PDI, potencial zeta e pH.

2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante das nanoemulsões foi avaliada por ABTS e DPPH. Ambos os métodos são bastante utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos oleosos orgânicos. O método ABTS é baseado na captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina6- ácido sulfônico) (ABTS⁺), que ocorre através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Essa metodologia é bastante utilizada para medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (Borges *et al.*, 2011). A atividade de captura de radical livre ABTS^{•+} foi medida pelo método descrito por (Ribeiro *et al.*, 1999). O cátion ABTS foi gerado por 5 mL de solução-estoque de ABTS (7 mmol/L-1) com 88,0 µL de solução de persulfato de potássio. A atividade antioxidante frente ao radical ABTS foi determinada no tempo inicial e 30 dias de armazenamento, em três diferentes armazenamentos, temperatura ambiente, câmara climática e sob refrigeração.

A determinação da atividade antioxidante das nanoemulsões contendo óleo de açaí e do óleo livre pelo método DPPH foi realizada conforme descrito por (Brand-Williams; Cuvelier; Berset, 1995), atualizado por (Roesler *et al.*, 2007) com algumas modificações. Foi feita a avaliação das nanoemulsões por emulsificação espontânea e alta agitação, e do óleo de açaí na sua forma livre (OL), no OL os constituintes foram: óleo de açaí (10 %), Span 80 (4 %), Tween 80 (4 %) e acetona (12,5 mL), por conta da difícil diluição do óleo de açaí utilizou-se os mesmos constituintes utilizados no preparo da nanoemulsão de alta agitação, porém com quantidade menor de acetona, até que houvesse a completa diluição do óleo de açaí. A atividade antioxidante foi determinada no tempo zero e após 30 dias de armazenamento, em três diferentes temperaturas, a temperatura ambiente, câmara climática e sob refrigeração.

2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A verificação da possível atividade antimicrobiana das nanoemulsões foi realizada através do método de Disco-Difusão. O método baseia-se no princípio da difusão no meio, ou seja, a capacidade do composto difundir-se no ágar através de um disco de papel filtro saturado, no presente estudo, a solução da nanoemulsão. A metodologia utilizada seguiu as instruções do SLCI (Mo2-A12), desta forma com o auxílio de uma alça bacteriológica calibrada de 1 uL, alíquotas das colônias dos

microrganismos de duas leveduras *Candida albicans* ATCC 90018 e *Candida albicans* ATCC 14053, e duas bactérias gram negativas *Escherichia coli* ATCC 25923 e *Klebsiella pneumoniae* foram retiradas de suas placas de culturas, antecipadamente incubadas por 24h e 48h a 37°C, e suspendidas em 5 mL de salina 0,9% (NaCl) para obter-se o inóculo bacteriano e fúngico em suas respectivas escalas 0,5 e 1,0 McFarland preconizadas. Após essa etapa foi feito a semeadura deste inóculo em estrias formando um tapete uniforme em três direções diferentes, vertical, horizontal e diagonal, após a formação deste “tapete” os discos são colocados na superfície do ágar com 10uL dos compostos para que a difusão do mesmo possa acontecer devido ao gradiente de concentração, por fim as placas foram incubadas por 24h a 37°C e 48h para as leveduras, a leitura das placas foi realizada após o tempo de incubação para observar se havia a presença ou não do halo de inibição, medido em mm.

A avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo conforme protocolo M7-A6 descrito por (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2003), com modificações. As cepas foram fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia Oral (LAPEMICRO), da Universidade Federal de Santa Maria. Basicamente, para isolamento e purificação, as cepas foram semeadas em ágar Nutriente (KASVI®) a 37°C por 24 horas. Após o crescimento, o inóculo foi preparado adicionando duas a três colônias em solução salina estéril 0,9% e a turbidez foi padronizada na escala 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ cel/mL) em densitômetro de bancada (DEN-1). As suspensões foram diluídas a 1:20 em caldo Muller Hinton (KASVI®). O ensaio foi realizado usando microplacas de 96 poços, cobertas com 100 µL de uma diluição seriada dos compostos em caldo Muller Hinton nos poços 1–10. As linhas 11 e 12 foram utilizadas para os controles negativo (somente meio) e positivo (meio e inóculo), respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano visível na placa.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente através de análise de variância de uma via (ANOVA), seguido de *post hoc* de *Dunnet* a 95% de confiança, utilizando

o programa estatístico e de confecção gráfica *GraphPad Prism* (*GraphPad Prism software*, 2015; San Diego, CA, USA) versão 7.7. Os resultados onde $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE

Dentre os ácidos graxos presentes no óleo, os que predominaram foram os poli-insaturados, ômega 6 (ácido linoleico) e ômega 3 (ácido oleico). Após o preparo, as nanoemulsões produzidas em Ultra-Turrax® apresentaram diâmetro médio de gotícula e índice de polidispersividade em torno de 84 nm e 0,2, respectivamente, potencial zeta de aproximadamente -8 mV e pH ácido, por outro lado, as produzidas em evaporador rotatório apresentaram diâmetro médio e índice de polidispersividade em torno de 175 nm e 0,1, respectivamente, potencial zeta de aproximadamente -16 mV e pH ácido. Ambas as formulações apresentaram propriedades nanométricas adequadas pois, nanoemulsões são dispersões de dois líquidos imiscíveis, com diâmetro médio de gotícula em tamanho nanométrico de 20 a 500 nm (Quintão *et al.*, 2013; Zorzi *et al.*, 2015).

3.2 CROMATOGRAFIA GASOSA

Os três componentes majoritários do óleo identificados por cromatografia gasosa foram: ácido linoleico $45,5\% \pm 0,403$, ácido oleico $31,4\% \pm 0,282$, ácido palmítico $15,8\% \pm 0,133$ e ácido esteárico $2,9\% \pm 0,202$.

3.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA

A análise morfológica por microscopia eletrônica de força atômica das nanoemulsões contendo óleo de *Euterpe oleracea* Mart, mostrou gotículas esféricas e nanométricas corroborando com os dados obtidos na técnica de espalhamento de luz dinâmico.

3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As nanoemulsões e o óleo livre foram analisadas no tempo zero e após 30 dias nas diferentes condições de armazenamento propostas pelo estudo. Nos dois métodos, DPPH e a ABTS tanto o óleo livre quanto as nanoemulsões apresentaram baixa atividade sequestrante.

4. CONCLUSÃO

O estudo realizou com êxito nanoemulsificação do óleo de açaí (*Euterpe oleracea Mart.*) através dos dois métodos propostos nas concentrações de 5% e 1,6% de óleo, respectivamente, que após o preparo apresentaram propriedades nanométricas adequadas. Destaca-se a importância da análise de estabilidade nas diferentes condições de temperatura e nos diferentes tempos. As amostras mantidas sob temperatura ambiente a 25°C e refrigeração a 4°C demonstraram manter as propriedades com baixo grau de variação durante os 90 dias de armazenamento enquanto, as armazenadas a 40°C tiveram alterações nas propriedades organolépticas e redução no pH o que é sugestivo de perda da estabilidade. Quanto à atividade antioxidante tanto o método ABTS quanto método DPPH, mostraram que o óleo de açaí na forma livre e as nanoestruturas não apresentaram atividade sequestrante de radicais livres, sendo sugestivo de que depende do substrato e das condições experimentais, as variações no perfil fenólico presentes no produto natural. Indicando grande probabilidade de fatores pré e pós-colheita interferir nas características qualitativas e nutricionais do açaí. O óleo de açaí livre e nanoemulsionado não demonstrou atividade antimicrobiana significativa, fato que pode estar relacionado com a composição do óleo empregado a qual sofre influência de vários fatores como época da colheita e condições climáticas.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, M.L. *et al.* Antimicrobial activity of oils extracted from acai and pupunha on developing *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 4, p. 985-990, 2013.

BORGES, L. L. *et al.* Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1-20, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie – Food Science and Technology*, London, v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.

CASTRO, R.C. *et al.* Extração e análise de propriedade físico-químicas do óleo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. 1-5, 2021. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17358>

Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. M7-A6. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2003.

FERNANDEZ, P. *et al.* Nanoemulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and surfaces A: Physicochem Engineering Aspects**, v. 251, p. 53-58, 2004.

MENEZES, E.M.S.; TORRES, A.T.; SRUR, A.U.S. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) liofilizada. **Acta Amazônica**, v. 38, n. 2, p. 311-316, 2008.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

PRIMO F.L., MACAROFF P.P., LACAVA Z.G.M., AZEVEDO R.B., MORAIS P.C., ET AL. Binding and photophysical studies of biocompatible magnetic fluid in biological medium and development of magnetic nanoemulsion: A new candidate for cancer treatment. **J. Magn. Magn. Mater.** v. 310, p. 2838-40, 2007.

QUINTÃO, F. J. O. *et al.* Hydroalcoholic extracts of *Vellozia squamata*: study of its nanoemulsions for pharmaceutical or cosmetic applications. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n.1, p.101-107, 2013.



RASHEED, M.U. *et al.* Antimicrobial drug resistance in strains of escherichia coli isolated from food sources. **Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 341-346, 2014.

RIBEIRO, J. E. L. S. *et al.* Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares da Reserva Ducke. Manaus: **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia** - INPA 1999.

ROESLER, R. *et al.* Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, n.3, p. 1048 – 1054, 2007.

SARAF, S. A. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 680 – 689, 2010.

VISENTAINER, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 274-279, 2012.

ZORZI, G. K. *et al.* On the use of nanotechnology-based strategies for association of complexes matrices from plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.25, n.1, p. 426-436, 2015.