POTENCIAL ANTIMICROBIANO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS A PARTIR DO EXTRATO DA CASCA DA SEMENTE DA *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA* SOBRE MICRORGANISMOS ISOLADOS DO CONDUTO AUDITIVO DE CÃES ACOMETIDOS POR OTITE EXTERNA

TALITA FERREIRA ZEFERINO ¹, LETÍCIA VIVIANE DE JESUS ², KARINA RAMIREZ STARIKOFF ³, KATHARINE MARGARITHA SATIRO BRAZ ⁴, LETIÉRE CABREIRA SOARES ⁵, FERNANDA OLIVEIRA LIMA ⁶, DALILA MOTER BENVENEGÚ ⁷

1 Introdução

Na prática médica veterinária de pequenos animais, problemas de pele são comuns e frequentemente requerem tratamentos demorados e dispendiosos. A otite, uma das dermatopatias mais prevalentes em cães, é uma inflamação no canal auditivo que afeta diferentes estruturas anatômicas. Existem três tipos de otite: externa, que envolve o pavilhão auricular e os canais auditivos; média, que afeta a bulha timpânica e ossículos auditivos; e interna, que compromete a cóclea e os nervos cranianos (HORTA et al., 2013).

O uso adequado de tratamentos específicos é necessário para evitar resistência bacteriana e a cronicidade das condições (HORTA et al., 2013). No entanto, o uso excessivo de antibióticos levou ao surgimento de resistência bacteriana. Nesse contexto, compostos naturais de plantas, como a *Araucaria angustifolia*, têm sido explorados por suas propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias (SHAHZAD ASLAM et al., 2013).

A nanotecnologia tem se mostrado promissora para melhorar a biodisponibilidade e a absorção de princípios ativos, incluindo tratamentos à base de plantas (AHMED; NABAVI; BEHZAD, 2020; IRACHE et al., 2011). Essa abordagem envolve o uso de nanopartículas, que podem ter propriedades ópticas, magnéticas e elétricas únicas (FINDIK, 2021).

As nanopartículas, como as de prata (AgNPs), apresentam propriedades biológicas aplicáveis na detecção e tratamento de doenças (AHMED et al., 2021). As AgNPs possuem propriedades antimicrobianas, cicatrizantes e anti-inflamatórias (DAVID et al., 2014; RIZZELLO;

¹ Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Realeza-PR, contato: talitaf.uffs@gmail.com

² Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Realeza-PR, contato: leticia.jesus@estudante.uffs.edu.br

³ Professora Doutora em Epidemiologia Experimental, UFFS, *Campus* Realeza-PR

⁴ Graduanda em Ciências Biológicas, UFFS, *Campus* Realeza-PR

⁵ Professor Doutor em Química Orgânica, UFFS, *Campus* Realeza-PR

⁶ Professora Doutora em Química Analítica, UFFS, *Campus* Realeza-PR

⁷ Professora Doutora em Farmacologia, UFFS, *Campus* Realeza-PR, **Orientadora**.

POMPA, 2014). Além disso, usar extratos de plantas, como a *A. angustifolia*, é uma alternativa ecologicamente correta para a produção de AgNPs (BONNIA *et.al.*, 2016).

O uso de AgNPs a partir do extrato de semente de *A. angustifolia* para tratar otite canina é promissor, aproveitando os compostos ativos da planta e promovendo uma abordagem sustentável.

2 Objetivos

Avaliar os efeitos antimicrobianos das nanopartículas de prata sintetizadas a partir do extrato da casca da semente (pinhão) da *Araucária angustifolia*, em isolados bacterianos obtidos a partir de cães acometidos pela otite externa.

3 Metodologia

Foi conduzido um experimento no qual as nanopartículas de prata, produzidas a partir do extrato do pinhão, foram avaliadas em amostras previamente coletadas dos canais auditivos de cães que apresentaram sinais clínicos de otite externa na qual foi coletado amostras de cerume do ouvido esquerdo (E) e direito (D) de 3 cães (animal 1, animal 2 e animal 3) afetados por otite externa, designadas como E1 e D1, E2 e D2 e E3 e D3.

As amostras foram coletadas na Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária (SUHVVU) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) no Campus Realeza-PR, durante o período de março a junho de 2023. O protocolo deste estudo recebeu aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número de protocolo 23205.001510/2018-31. Todas as análises foram conduzidas no laboratório de microbiologia e química da mesma universidade, especificamente no Campus Realeza-PR da UFFS.

Os extratos foram obtidos por meio de uma extração sólido-líquido utilizando cascas de pinhão secas e trituradas. Inicialmente, as cascas de pinhão foram trituradas com um processador de alimentos, e 8,75g delas foram pesados utilizando uma balança analítica. De acordo com a metodologia adaptada de Raota (2018), as extrações foram realizadas utilizando uma mistura de etanol 50% (v/v) e água como solventes. As cascas trituradas foram colocadas em um béquer de 100 mL, equipado com uma barra magnética. O solvente (100 mL) foi então adicionado às cascas, seguido da adição de 2 mL de uma solução de NaOH 1 M. A mistura foi aquecida a 40 °C e mantida nessa temperatura por um período de 15 a 30 minutos. Após a agitação, o aquecimento foi interrompido, permitindo o resfriamento da solução até atingir a temperatura ambiente. Em

seguida, a mistura foi filtrada para remover as partículas sólidas, conforme descrito por Raota (2018).

Para realizar a síntese das nanopartículas de prata, foram seguidos os seguintes passos: em um tubo de ensaio de 20 mL, foi acrescentado 1.000 mL de uma solução de AgNO₃ (0,001 M). O pH da solução de nitrato de prata foi então ajustado para 8,0 utilizando uma solução de NaOH (0,5 M). Em seguida, foi adicionado o extrato obtido acima (1.000 mL) à solução. Após essa adição, a solução foi agitada e, em seguida, foram iniciados os testes microbiológicos.

O extrato da casca da semente (pinhão) da *Araucária angustifolia*, resultou em quatro formulações distintas: uma contendo nanopartículas de prata aquecidas a 40°C por 15 minutos, outra com nanopartículas de prata aquecidas a 40°C por 30 minutos, um extrato sem nanopartículas aquecido a 40°C por 15 minutos e outro sem nanopartículas aquecido a 40°C por 30 minutos.

Após a obtenção dos extratos, foi conduzida a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em duplicata, sendo empregada a técnica de microdiluição em microplacas, conforme as diretrizes do CLSI 2015. Em microplacas, 180 µL de caldo BHI/Sabouraud foram inicialmente adicionados ao primeiro poço, seguidos por 100 µL do mesmo caldo nos poços seguintes. No primeiro poço, 20 µL de nanopartículas de prata sintetizadas a partir da casca do pinhão, em conjunto com 1% de polissorbato 80, foram adicionadas, começando com uma concentração de 10%. Diluições em série de 1:2 foram realizadas nos demais poços da microplaca, resultando em concentrações de 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,312%, 0,156%, 0,078%, 0,039% e 0,0195%, totalizando nove diluições sequenciais. Em cada poço, 10 µL de inóculo foram adicionados. Dois controles foram feitos: um com meio de cultura e AgNPs sintetizadas a partir da casca do pinhão e outro com meio de cultura e inóculo.

A microplaca foi inicialmente lida em um espectrofotômetro a 625 nm. Em seguida, foi incubada a 37 °C por 24/48 horas, seguida de uma nova leitura no mesmo comprimento de onda. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada usando resazurina a 0,01%, adicionando 25 µL em cada poço da microplaca. Após uma incubação de uma hora a 37 °C, foi realizada uma nova leitura. A presença de coloração azul indicou a ausência de crescimento microbiano, enquanto a coloração rosa/vermelha indicou o metabolismo celular e, portanto, crescimento microbiano (ARAUJO; LONGO, 2016).

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi avaliada através da semeadura do conteúdo de cada poço em placas de ágar Mueller Hinton, incubadas a 37 °C por 24 horas, observando-se a presença ou ausência de crescimento bacteriano (ARAUJO; LONGO, 2016).

4 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos revelaram um efeito bacteriostático. Nas amostras de todos os 3 animais, foi observado crescimento bacteriano suficiente para continuar o estudo. A etapa seguinte envolveu a identificação das bactérias presentes, revelando a presença de *Staphylococcus* sp nas amostras dos 3 animais.

Tabela 1: Resultados da Concentração Inibitória Mínima

	Nano 30min	Nano 15min	Extrato 30	Etrato 15
E1	Não teve inibição	Não teve inibição	Não teve inibição	Não teve inibição
D1	Não teve inibição	Não teve inibição	Não teve inibição	Não teve inibição
E2	Não teve inibição	Não teve inibição	Não teve inibição	Teve inibição (2.5%)
D2	Teve inibição (2,5%)	Não teve inibição	Não teve inibição	Não teve inibição
E3	Não teve inibição	Não teve inibição	Não teve inibição	Não teve inibição
D3	Não teve inibição	Não teve inibição	Não teve inibição	Não teve inibição

Fonte: Elaborada pelos autores (2023).

Após a obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM), avaliamos a Concentração Bactericida Mínima (CBM), e todas as concentrações resultaram em crescimento bacteriano, indicando que as bactérias não foram totalmente erradicadas. Os microrganismos persistiram após exposição aos extratos testados.

A ação das nanoformulações, especialmente AgNPs, contra microrganismos ainda não está totalmente compreendida. De acordo com estudos recentes (BRITO et al., 2022), AgNPs demonstram um excelente potencial contra microrganismos resistentes. Isso levanta questões sobre sua eficácia, mecanismo de ação e a necessidade de padronização das técnicas utilizadas para pesquisas futuras.

As AgNps, que foram sintetizadas através de uma abordagem sustentável (Gomes et.al., 2020), exibiram uma notável atividade antimicrobiana, especialmente contra as bactérias Gram-positivas, com destaque para as cepas de *S. aureus*. Com a alta patogenicidade e a tendência à multirresistência dessa espécie, os resultados indicam que as AgNPs sintetizadas no estudo são promissoras no combate à resistência bacteriana.

É essencial padronizar e validar todos os componentes dos testes para garantir resultados confiáveis e reproduzíveis. Isso beneficiará pesquisadores atuais e futuros na escolha de protocolos adequados para combater infecções hospitalares. No entanto, os estudos sobre o tratamento da otite com nanopartículas de prata são limitados e exigem mais pesquisas.

5 Conclusão

Diante do exposto, constatou-se que a concentração utilizada não se mostrou adequada para desencadear a inibição completa do crescimento bacteriano. Em consequência, o efeito observado foi de natureza bacteriostática, ou seja, houve uma supressão do crescimento das bactérias, porém sem a eliminação total das mesmas.

Referências Bibliográficas

AHMED, H. M.; NABAVI, S.; BEHZAD, S. Herbal Drugs and Natural Products in the light of Nanotechnology and Nanomedicine for Developing Drug Formulations. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 21, n. 3, p. 302–313, 2020.

AHMED, H. M. et al. Applications of Nanomaterials in Agrifood and Pharmaceutical Industry. *Journal of Nanomaterials*, v. 2021, 2021.

ARAUJO, M. M.; LONGO, P. L. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 83, p. 1-7, 2016.

BONNIA, N. N. et al. Green Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using ‘*Polygonum Hydropiper*’ and Study its Catalytic Degradation of Methylene Blue. *Procedia Chemistry*, v. 19, p. 594–602, 2016.

BRITO, Josimar Elpídio de et al. Ação antimicrobiana das nanopartículas de prata (AgNPs) estabilizadas em extrato de jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.). 6 nov. 2022.

FINDIK, F. Nanomaterials and their Applications. *Periodicals of Engineering and Natural Sciences*, v. 9, n. 3, p. 62–75, 2021.

HORTA, R. DOS S. et al. Dermatologia em cães e gatos. *Cadernos técnicos de Veterinária e Zootecnia*, v. 71, p. 1–144, 2013.

SHAHZAD ASLAM, M. et al. Phytochemical and ethno-pharmacological review of the genus *Araucaria* - Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 4, p. 651–659, 2013.

RIZZELLO, L.; POMPA, P. P. Nanosilver-based antibacterial drugs and devices: Mechanisms, methodological drawbacks, and guidelines. *Chemical Society Reviews*, v. 43, n. 5, p. 1501–1518, 2014.

Palavras-chave: Mecanismo de ação, padronização, resistência bacteriana e nanotecnologia.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2022 - 0273

Financiamento: Fundação Araucária