

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOEMULSÃO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *ZINGIBER OFFICINALE*

Micaela Horst Milanez, Gabrielly Nascimento Ribeiro, Carlos Eduardo de Souza Duarte, Juliana Alves Resende, Délia Chaves Moreira dos Santos.

Universidade Federal do Espírito Santo - Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde (CCENS),
Alto Universitário, S/N - Guararema, Alegre, Espírito Santo - 29500000, Brasil,
micaelamilanez@gmail.com, gabynascimentoribeiro@gmail.com, carloosedu.souzaduarte@gmail.com,
ju.alves.resende@gmail.com, deliachavesmoreira@gmail.com.

Resumo

O óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*) apresenta atividades farmacológicas relevantes, mas sua instabilidade frente a fatores ambientais limita a aplicação, exigindo estratégias para maior estabilidade e eficácia. As nanoemulsões (NEs), são sistemas com partículas nanométricas, surgem como alternativa promissora para superar essa instabilidade. Neste sentido, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana das NEs contendo óleo essencial de gengibre (OEG) frente a linhagens de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A formulação foi preparada com 5% de OEG, 5% de tensoativos (Tween 80 e Span 80) e 90% de água deionizada, utilizando homogeneização com Ultra-Turrax e Ultrassom. Para avaliação antimicrobiana foi utilizado o método de diluição em caldo, com ajuste do inóculo pela escala de McFarland e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Não houve crescimento bacteriano na diluição 10^{-2} e na 10^{-3} houve crescimento reduzido, enquanto os controles apresentaram crescimento incontável. Esses resultados indicam que as NEs com OEG possuem ação antimicrobiana significativa e potencial para aplicações farmacêuticas futuras.

Palavras-chave: Gengibre. Óleo essencial. Nanoemulsão. *Staphylococcus aureus*. *Escherichia coli*.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Farmácia

Introdução

O *Zingiber officinale*, popularmente conhecido como gengibre, possui rizoma ramificado, com cheiro e sabor picante e agradável (Majolo *et al.*, 2014). Os óleos essenciais (OEs) são substâncias voláteis de plantas aromáticas, reconhecidas por propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antifúngicas (Oliveira; Moraes, 2019). O óleo essencial de gengibre (OEG) possui compostos com importantes atividades antioxidantes e antimicrobianas, porém sua sensibilidade a fatores ambientais e volatilidade limita seu uso, exigindo estratégias para aumentar a estabilidade e eficácia (Singh *et al.*, 2017). A preparação de nanoemulsões (NEs) pode ser uma alternativa útil para a incorporação de OEs, já que compostos hidrofóbicos podem ser dispersos em água em partículas nanométricas, contribuindo na redução da volatilidade (Fontes *et al.*, 2021). Esses sistemas podem contribuir para o aumento da eficácia, da estabilidade e da biodisponibilidade de ativos farmacológicos (McClements, 2011; Singh *et al.*, 2017). As NEs são sistemas de emulsão de óleo em água ou água em óleo com partículas menores, divididas em dois grupos: transparentes e translúcidas (50-200 nm) e opalescentes (>500 nm) (Pires, 2016). Quanto menor o tamanho da partícula de uma nanoemulsão (NE), melhor será sua distribuição e estabilidade, aumentando sua eficiência no transporte de fármacos ativos (Yukuyama *et al.*, 2015).

As bactérias *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*) estão entre os principais agentes relacionados a infecções e intoxicações em humanos (Levy *et al.*, 2004). *S. aureus* é um coco Gram-positivo capaz de produzir toxinas termooestáveis, responsáveis por casos frequentes de intoxicação alimentar (Bresolin *et al.*, 2005). Já *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa presente na microbiota intestinal, inclui cepas patogênicas associadas a doenças como infecções urinárias e gastroenterites (Prère; Fayet, 2005). A crescente resistência antimicrobiana desses microrganismos é uma preocupação global, pois dificulta o tratamento e favorece a disseminação de cepas multirresistentes (Who, 2015).

Cutrim *et al.* (2019) demonstraram que o OEG apresenta eficácia antimicrobiana em cepas de *E. coli* e *S. aureus* a partir de testes de difusão de disco. Wang *et al.* (2020) também demonstraram eficácia

do OEG contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, o qual age destruindo a membrana das células das bactérias, aumentando sua permeabilidade e fazendo, então, com que elas percam a função estrutural básica, ocasionando sua morte. Silva *et al.* (2018) estudaram a ação antimicrobiana do OEG encapsulado em fibras de proteínas ultrafinas com o intuito de aplicá-lo em embalagens de queijo Minas fresco, para assim inibir o crescimento de bactérias patogênicas, como a *L. monocytogenes*, durante o armazenamento refrigerado, e os testes demonstraram ótima ação antimicrobiana do OEG encapsulado frente a todas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas estudadas. Entretanto, ainda não foi avaliada a eficácia de NEs contendo OEG contra cepas de *S. aureus* e *E. coli* em enfermidades humanas.

Portanto, este trabalho teve como objetivo preparar NEs contendo OEG para, em seguida, avaliar sua atividade antimicrobiana contra cepas de *S. aureus* e *E. coli*.

Metodologia

Preparo da NE contendo OEG

A NE contendo OEG foi obtida utilizando-se uma fase oleosa (FO) constituída por 5% de OE e 5% de uma mistura de surfactantes (Tween 80 e Span 80), e uma fase aquosa (FA) composta por 90% de água deionizada. O processo de preparação ocorreu em duas etapas: primeiramente, a FA foi adicionada gradualmente à FO sob agitação mecânica no Ultra-Turrax (T10 basic Ika) por 5 minutos, seguida de homogeneização por ultrassom com sonda de alta potência (Hielscher UP100H) por 10 minutos, operando a 60% de amplitude.

Avaliação da atividade antimicrobiana da NE contendo OEG

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de diluição em caldo, com ajuste do inóculo segundo a escala de McFarland (0,5), conforme recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2020) e por Silva *et al.* (2017), utilizando duas linhagens padrão: *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923). As culturas foram reativadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) a 35 ± 2 °C por 24 horas, sendo posteriormente transferidas para ágar BHI e incubadas novamente nas mesmas condições por mais 24 horas. Inicialmente, os inóculos foram preparados a partir de colônias isoladas cultivadas em ágar BHI. Em seguida, essas colônias foram suspensas em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e ajustadas à turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland ($\approx 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) para ambas as cepas. A partir dessas suspensões iniciais ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), foram realizadas diluições sucessivas: 100 µL da suspensão foi adicionado a 9.900 µL de solução salina estéril, obtendo-se uma diluição 10^{-2} . Em seguida, 300 µL dessa diluição foram transferidos para 29.700 µL de caldo Müeller-Hinton (CMH), resultando em uma diluição final de 10^{-4} para cada microrganismo.

Para cada suspensão diluída (10^{-4} em CMH), retirou-se 3 mL e adicionou-se 1 mL da NE contendo OEG. Após 24 horas de incubação, foram preparadas diluições seriadas (10^{-3} e 10^{-2}) para a avaliação microbiológica. Em seguida, 100 µL de cada diluição foram semeados em duplicata em placas de ágar Caseína, utilizando alça de Drigalski para espalhamento uniforme. Foram incluídos controles de crescimento (inóculo + meio de cultura) e controle de esterilidade (apenas CMH). As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas. Após esse período, realizou-se a contagem de colônias para determinação da concentração em Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL), utilizando a fórmula (1):

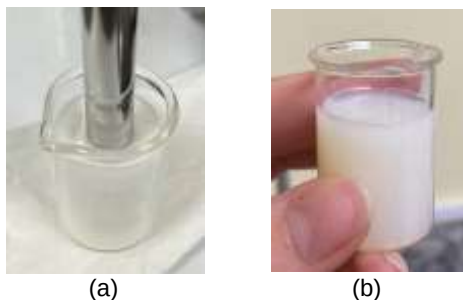
$$UFC/mL = \frac{(n^\circ \text{ de UFC} \times \text{fator de diluição})}{(\text{alíquota de plaqueamento})} \quad (1)$$

Resultados

Preparo das NEs contendo OEG

As NEs contendo OEG foram preparadas conforme Figura 1, a qual ilustra a homogeneização inicial com Ultra-Turrax e a mudança no aspecto da NE após o uso do ultrassom, indicando que o equipamento promove alta taxa de cisalhamento, reduzindo o tamanho das partículas das NEs.

Figura 1 - Mudanças nas características físicas das NE;
(a) após 5 minutos de homogeneização com Ultra-Turrax e (b) após 10 minutos de Ultrassom.



Fonte: Elaborado pelas próprias autoras.

Avaliação da atividade antimicrobiana da NE contendo OEG

Para a avaliação da atividade antimicrobiana da NE contendo OEG, prepararam-se soluções nas diluições 10^{-3} e 10^{-2} (Figura 2), contendo a NE, a partir de uma diluição inicial de 10^{-4} obtida de suspensões com concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL das bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

Figura 2 - Soluções contendo as cepas dos microrganismos e NE com OE de gengibre.
(a) contendo *S. aureus* (b) contendo *E. coli*.



Fonte: Elaborado pelas próprias autoras.

Alíquotas de 100 μ L dessas diluições foram semeadas em duplicata em placas de ágar Caseína, utilizando-se alça de Drigalski para espalhamento uniforme. Além dessas, foram preparadas placas-controle de crescimento (inóculo + meio de cultura). As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas, e os resultados do crescimento microbiano estão apresentados na Figura 3 para *S. aureus* e Figura 4 para *E. coli*.

Figura 3 - Resultados das placas de *S. aureus*



Fonte: Elaborado pelas próprias autoras.

Figura 4 - Resultados das placas de para *Escherichia coli*.



Fonte: Elaborado pelas próprias autoras.

Para ambas as linhagens testadas na diluição 10^{-2} , não houve crescimento microbiológico, indicando que, nessa concentração, a NE contendo OEG foi capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano. Na diluição 10^{-3} , observou-se crescimento de colônias em ambas as cepas com a média de 9 e 43,5. O média d UFC/mL foi de $2,2 \times 10^4$ para *S. aureus*, e $4,5 \times 10^3$ para *E. coli*. A Tabela 1 apresenta a contagem de colônias (UFC) por placa, e os resultados de UFC/mL obtidos com base na Fórmula (1).

Os resultados observados nas diferentes diluições demonstram o impacto da concentração da NE com OEG. Na diluição 10^{-2} , que é a menos diluída, tem a maior concentração de NE contendo OEG, que foi eficaz em inibir o crescimento bacteriano, resultando na ausência de colônias. Por outro lado, na diluição 10^{-3} , que é a mais diluída, tem a menor concentração de NE contendo OEG, possibilitou o desenvolvimento bacteriano, com a formação de colônias visíveis. Esses resultados corroboram a ação antimicrobiana da formulação, evidenciando que a restrição do crescimento de microrganismos está diretamente relacionada à quantidade de OEs presente nas amostras.

Tabela 1 - Contagem de Unidades Formadoras de Colônia por placa.

	Contagem de colônias (UFC) por placa		UFC/mL	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
10^{-2}	0	0		
	0	0		
10^{-3}	8	13		
	10	74	$4,5 \times 10^3$	$2,2 \times 10^4$
Controle 10^{-2}		Incontáveis		
Controle 10^{-3}		Incontáveis		

Fonte: Elaborado pelas próprias autoras.

Discussão

No estudo realizado por Noori *et al.* (2018) foi utilizado NEs contendo o OEG junto de um polímero (caseinato de sódio) para estudar se o filme formado por esses dois teria ação antimicrobiana no armazenamento de frangos frescos. A partir do uso do teste de disco de difusão, eles obtiveram resultados significativos da inibição das bactérias *S. typhimurium* e *L. monocytogenes* por compostos bioativos do OE presente na NE, com halos de inibição de $8,66 \pm 0,94$ mm e $10,33 \pm 0,93$ mm, respectivamente.

Em outro estudo, feito por Ibrar *et al.* (2022), foi testada a NE com OEG contra bactérias Gram-positivas (*B. spizizenii* e *S. aureus*) e Gram-negativas (*E. coli* e *S. enterica*) com ensaio de disco difusão em placa e comparada com o controle positivo do sulfato de neomicina (antibiótico). Tendo como resultado halos de inibição da NE com média de 25,99 mm enquanto a do sulfato de neomicina foi de 13,78 mm, mostrando assim a eficácia das NEs para suprimir o crescimento desses microrganismos.

Os resultados deste trabalho são preliminares e serão importantes para elencar uma formulação de NE contendo OEG, com características físico-químicas adequadas, que poderá ser utilizada para estudos posteriores de eficácia para possíveis doenças causadas por microrganismos.

Conclusão

As NEs mostram-se como sistemas promissores já que proporcionam elevada estabilidade do OEG pela sua encapsulação em escala nanométrica. Neste estudo, foi desenvolvida uma NE contendo o OEG, utilizando tensoativos e técnicas combinadas de Ultra-Turrax e ultrassom.

Os resultados evidenciaram atividade antimicrobiana significativa contra *E. coli* e *S. aureus*, com redução drástica ou ausência de unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas tratadas com a nanoemulsão, em comparação com os controles. Esses achados demonstram que a NE contendo OEG apresentou ação antimicrobiana significativa, evidenciando seu potencial como estratégia eficaz para controle de microrganismos e aplicações farmacêuticas futuras, promovendo melhor incorporação do óleo, reduzindo sua volatilização e potencializando sua eficácia.

Referências

- BRESOLIN, B. M. Z.; DALL'STELLA, J. K.; DA SILVA, S. E. F. Pesquisa sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* na mucosa nasal e mãos de manipuladores de alimentos em Curitiba/Paraná/Brasil. **Estudos de Biologia**, v.27, n.59, p. 27-32, 2005. DOI: <https://doi.org/10.7213/reb.v27i59.22709>.
- CUTRIM, E. S. M.; TELES, A. M.; MOUCHREK, A. N.; MOUCHREK FILHO, V. E.; EVERTON, G. O. Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Antioxidante dos Óleos Essenciais e Extratos Hidroalcoólicos de *Zingiber officinale* (Gengibre) e *Rosmarinus officinalis* (Alecrim). **Revista Virtual de Química**, v. 11 (1), p. 60-81, 2019. Disponível em: <http://static.sites.sbg.org.br/rvq.sbg.org.br/pdf/ElaineNoPrelo.pdf>. Acesso em: 26 ago. 2025.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2020. Disponível em: <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2025.
- FONTES, C. S.; GUEDES, N. A.; BOTELHO, B. O.; MARTINS, I. V. F.; COSTA, A. V.; SOARES, L. S.; QUEIROZ, V. T. Tópicos especiais em ciência animal X: Capítulo 13 - Potencial de nanoemulsões contendo óleos essenciais para o controle alternativo de dermatoses fúngicas em animais domésticos. **1. ed. Alegre, ES: CAUFES**, p. 233-253, 2021. Disponível em: https://cienciasveterinarias.ufes.br/sites/cienciasveterinarias.ufes.br/files/field/anexo/topicos_especiais_em_ciencia_animal_x_2021_0.pdf. Acesso em: 2 set. 2025.
- IBRAR, M.; AYUB, Y.; NAZIR, R.; IRSHAD, M.; HUSSAIN, N.; SALEEM, Y.; AHMAD, M. Garlic and ginger essential oil-based neomycin nano-emulsions as effective and accelerated treatment for skin wounds' healing and inflammation: *In-vivo* and *in-vitro* studies. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Vol. 30, Ed. 12, Pg. 1700-1709, 2022. DOI: 10.1016/j.jsps.2022.09.015.
- LEVY, C. E. *et al.* Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. In: Modulo I – Principais Síndromes Infecciosas. **1ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2004.
- MAJOLO, C.; NASCIMENTO, V.P.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de rizomas de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 505-512, 2014.
- MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter, Cambridge, UK**, v. 7, n. 6, p. 2297-2316, 2011. DOI: 10.1039/C0SM00549E.
- NOORI, S.; ZEYNALI, F.; ALMASI, H. Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. **Food Control**, Volume 84, p. 312-320, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.015>.
- OLIVEIRA, S.; MORAES, C. A. P. Desenvolvimento de uma emulsão o/a associada ao óleo essencial de gerânio (*Pelargonium graveolens*) e ao óleo essencial de palmarosa (*Cymbopogon martinii*). **Brazilian Journal of Natural Sciences**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 127, 2019. DOI: <https://doi.org/10.31415/bjns.v2i3.64>.
- PIRES, V. G. A. Incorporação de nanoemulsões de óleos essenciais de melaleuca, copaíba e limão em filmes de alginato de sódio para utilização como curativo. 2016. **Dissertação (Pós-Graduação em Ciência dos Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Universidade Estadual Paulista Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia do**

Campus de Ilha Solteira, São Paulo, 2016. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/138091>. Acesso em: 20 jun. 2025.

PRÈRE, M. F.; FAYET, O. A new genetic test for the rapid identification of shigatoxines producing (STEC), enteropathogenic (EPEC) *E. coli* isolates from children. **Pathologie Biologie, Paris**, v.53, p.466-469, 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017.

SILVA, F. T.; CUNHA, K. F.; FONSECA, L. M.; ANTUNES, M. D.; HALAL, S. L. M.; FIORETINI, A. M.; ZAVAREZE, E. R.; DIAS, A. R. G. Action of ginger essential oil (*Zingiber officinale*) encapsulated in proteins ultrafine fibers on the antimicrobial control in situ. **International Journal of Biological Macromolecules**, Volume 118, p. 107-115, 2018.

SINGH, Y. *et al.* Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>.

WANG, X.; SHEN, Y.; KIRAN, T.; HAN, J.; ZHANG, J.; FEI H.; WEI, Z. Antibacterial Activity and Mechanism of Ginger Essential Oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, [S. l.], p. 1-17, 30 ago. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25173955>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System: **Manual for Early Implementation**. Geneva: WHO, 36p. 2015.

YUKUYAMA, M. N.; GHISLENI, D. D. M.; PINTO, T. J. A.; BOU-CHACRA, N. A. Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics - a review. **International Journal of Cosmetic Science, Hoboken**, v. 37, p. 1–12, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/ics.12260>.

Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio da Fundação de Apoio à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) (Edital FAPES nº 21/2022), do Grupo Aplicado em Microbiologia (GrAM) do Laboratório de Análises Clínicas, do Laboratório de Produção Farmacêutica (LPF) e do Laboratório de Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos (LDPF) do Centro de Ciências da Saúde da UFES no campus de Alegre.