

# MODELO *EX VIVO* DE PELE DE PORCO PARA TESTE DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS, ÓLEOS VEGETAIS E PRODUTOS NATURAIS FORMULADOS

Rubem Crisney Salgado da Silva<sup>1\*</sup>, Iven Neylla. Farias Mendes<sup>2</sup>, Luiz Fernando Gomes<sup>3</sup>, Cristina de Andrade Monteiro<sup>4</sup>

## Resumo

No contexto de infecções de pele e de mucosas difíceis de tratar, agravadas por comorbidades e resistência microbiana, esta pesquisa buscou avaliar a ação de produtos naturais. Utilizando um modelo *ex vivo* com pele de porco, as feridas foram infectadas com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de pé diabético. Em seguida, foi aplicado o óleo essencial de melaleuca e uma alíquota padronizada do extrato do fungo de manguezal da cidade de São Luís- MA. Os resultados mostraram que ambos os produtos tiveram eficácia antimicrobiana contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. O óleo de melaleuca inibiu significativamente o crescimento da bactéria e evitou a formação de colônias nas feridas. De forma similar, o extrato fúngico reduziu drasticamente o crescimento bacteriano. Esses achados indicam que o óleo de melaleuca e o extrato do fúngico são promissores para o tratamento de infecções de pele, uma vez aliados à busca por novos alvos terapêuticos diante do contexto mundial de resistência microbiana.

**Palavras-chave:** Potencial antimicrobiano. Produtos naturais. Modelo *ex vivo*.

**Financiamento:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

## Introdução

A busca por novos tratamentos contra infecções de pele se tornou urgente diante da crescente resistência antimicrobiana, um problema que tem se agravado devido ao uso

---

<sup>1</sup> Graduando do Curso de Ciências Biológicas do IFMA Campus São Luís Monte Castelo; e-mail: rubemsalgado@acad.ifma.edu.br.

<sup>2</sup> Prof<sup>ta</sup>. Dr<sup>a</sup>. do Curso de Ciências Biológicas do IFMA Campus São Luís Monte Castelo; e-mail: prof.iven.mendes@acad.ifma.edu.br.

<sup>3</sup> Prof. Dr. do Curso de Ciências Biológicas do IFMA Campus São Luís Monte Castelo; e-mail: prof.luiz.gomez@acad.ifma.edu.br.

<sup>4</sup> Prof<sup>ta</sup>. Dr<sup>a</sup>. do Curso de Ciências Biológicas do IFMA Campus São Luís Monte Castelo; e-mail: cristinamonteiro@acad.ifma.edu.br.

excessivo de fármacos e a fatores como a pandemia de SARS-CoV-2. Este cenário levou a um aumento de pacientes com imunidade comprometida e de patógenos multirresistentes, como as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, que causam infecções oportunistas e são de difícil controle (Rawson *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020). Diante disso, a comunidade científica tem voltado sua atenção para bioprodutos de fontes naturais, como extratos de plantas e metabólitos microbianos, que podem oferecer grande potencial para se tornarem tratamentos eficazes, menos tóxicos e mais acessíveis (Gajdács *et al.*, 2021; Vila Nova *et al.*, 2024). A pesquisa por novas terapias também exige modelos de teste mais realistas e éticos, que reproduzam a infecção humana sem depender de animais de laboratório. O modelo de pele suína *ex vivo* é uma excelente alternativa, pois sua fisiologia é bastante similar à humana (Vila Nova *et al.*, 2024; Sousa *et al.*, 2023). Além de ser uma opção ética, ele tem custos mais acessíveis. Por isso, ele foi escolhido para esta pesquisa.

O presente estudo teve como objetivo principal estabelecer um modelo *ex vivo* de pele de porco, com feridas infectadas por *P. aeruginosa* e *S. aureus*, para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e de um extrato fúngico proveniente de sedimento de manguezal coletado em São Luís, no Maranhão. O trabalho busca, com isso, contribuir para a validação científica de produtos naturais e para o desenvolvimento de novas formulações antimicrobianas.

## Metodologia

Para o estudo, fora utilizada linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de úlceras de pé diabético e pertencentes à Coleção de Culturas DAB-IFMA-MTC. As bactérias foram cultivadas em meio Brain Heart Infusion (BHI) e, para os experimentos, ajustadas para uma concentração padrão de  $1 \times 10^8$  células/mL em PBS (Phosphate Buffer Saline). Antes de aplicar os tratamentos na pele suína, os produtos naturais foram testados para confirmar sua atividade antimicrobiana. O óleo essencial de melaleuca (100%) e um extrato fúngico (100%) foram avaliados usando os testes de **ágar difusão por cavidades** e de **microdiluição**, em meio de cultura Mueller Hinton (MH). A eficácia foi medida pelo diâmetro do halo de inibição de crescimento e pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento bacteriano. Como controle positivo, foi usada Ciprofloxacina (CLSI, 2019). Fragmentos de pele de porco (~2x2 cm) foram obtidos comercialmente e esterilizados

com álcool 70%, hipoclorito de sódio e água destilada. As amostras foram então colocadas sobre placas de Petri contendo agarose 0,7%. Feridas de 0,8 cm de diâmetro e 0,1 cm de profundidade foram criadas na derme usando um bisturi estéril. As feridas foram, então, infectadas com as bactérias padronizadas e incubadas por 48 horas. A eficácia dos tratamentos foi quantificada pelo teste de **microgota**, para contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). Um swab estéril foi usado para coletar amostras das feridas, que foram diluídas em série em PBS. Uma alíquota da última diluição foi semeada em ágar Mueller-Hinton e incubada para contagem das colônias após 24 horas, permitindo a análise da redução bacteriana. Após a infecção, para os tratamentos foram aplicados 50 µL/mL de óleo essencial de melaleuca e 50 µL do extrato fúngico em grupos distintos. As amostras foram incubadas por mais 24 horas. Fragmentos sem infecção e fragmentos infectados sem tratamento serviram como controles. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## Resultados e Discussão

O óleo essencial de melaleuca apresentou atividade antimicrobiana frente à infecção por *Pseudomonas aeruginosa*. Observa-se na figura 1 o halo expressivo e superior ao observado na presença de EEMt e do antibiótico CIP.

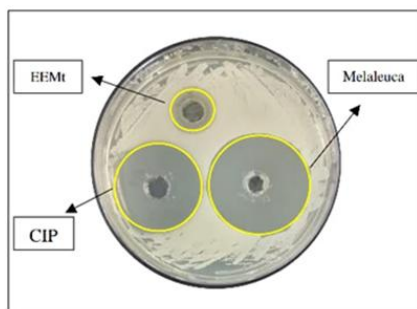


Fig. 1 – Halos de inibição de crescimento de *P. aeruginosa* de 16 mm (acima), 32 mm (à esquerda) e 36 mm (à direita) frente ao EEMt, CIP e OEM, respectivamente. Fonte: Autor, 2025.

Na figura 2 também é possível observar atividade biológica na triagem *in vitro* do extrato fúngico frente a mesma cepa de *P. aeruginosa*.

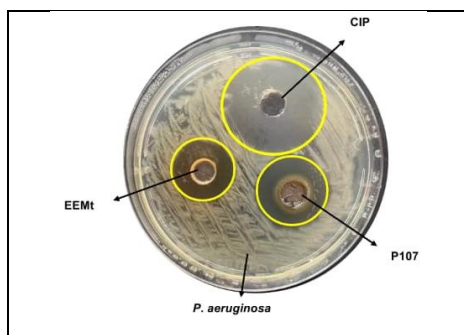


Fig. 2 – Halo de inibição de crescimento de *P. aeruginosa* de 18 mm (à direita inferior).  
Fonte: Autor, 2025.

Os resultados demonstram a forte ação antimicrobiana do óleo essencial de melaleuca e de um extrato fúngico de manguezal. A eficácia da melaleuca é atribuída a compostos como o terpinen-4-ol e o  $\gamma$ -terpineno, enquanto o extrato fúngico, rico em terpenos, alcaloides e flavonoides, também se mostrou promissor contra patógenos oportunistas como a *Pseudomonas aeruginosa* (Vila Nova *et al.*, 2024). Embora a Ciprofloxacina (CIP) também tenha inibido o crescimento bacteriano, a inibição proporcionada pelo óleo de melaleuca e pelo extrato fúngico é notável, especialmente por sua origem natural.

Halos de inibição contra *Pseudomonas aeruginosa*

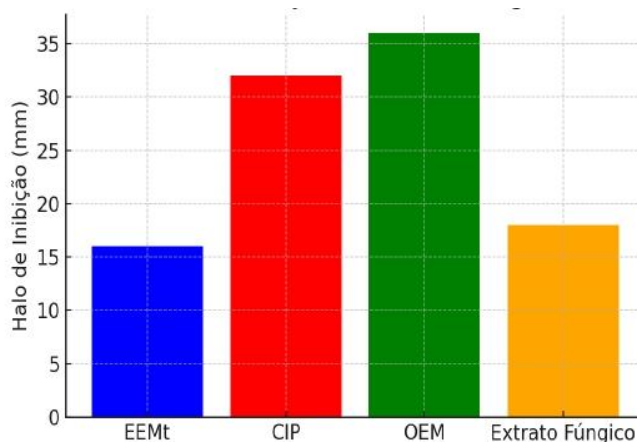


Fig. 3 - Halos médios de inibição de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* frente ao EEMt, ciprofloxacina (CIP), óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (OEM) e extrato fúngico de manguezal. Fonte: Autor, 2025.

Nos ensaios para determinação da menor concentração inibitória (CIM) capaz de inviabilizar o crescimento da bactéria patogêna, obteve-se CIM de 3,12% do OEM e CIM de 6,25% do extrato fúngico, conforme demonstram as Figuras 3 e 4.

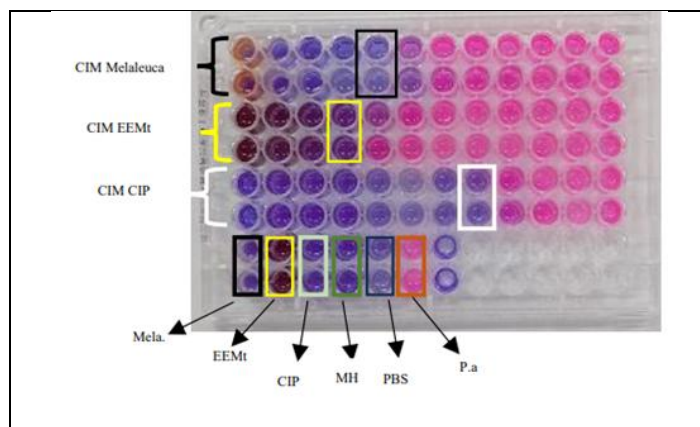


Fig. 4 – Determinação da CIM dos compostos avaliados por ensaio de microdiluição em caldo e da avaliação da atividade metabólica de *P. aeruginosa* com resazurina na presença e ausência das substâncias testadas. Fonte: Autor, 2025.

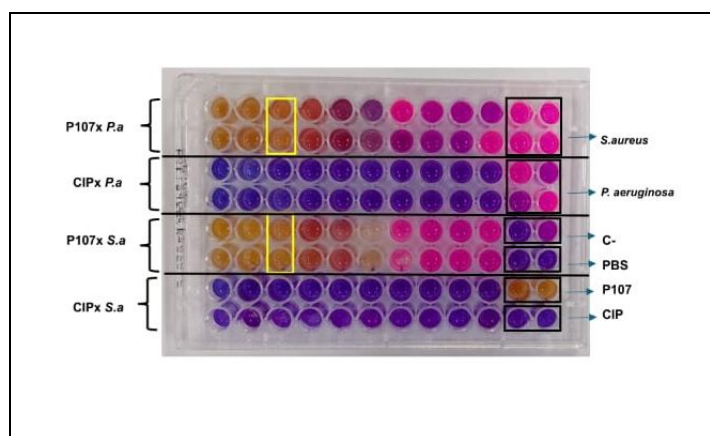


Fig. 5 – Determinação da CIM dos compostos avaliados por ensaio de microdiluição em caldo e da avaliação da atividade metabólica de *P. aeruginosa* com resazurina na presença e ausência das substâncias testadas. Fonte: Autor, 2025.

Apesar de a Ciprofloxacina (CIP) ser um antibiótico potente contra *P. aeruginosa*, a pesquisa mostrou que o óleo essencial de melaleuca (OEM) e o extrato de fungo também apresentaram uma eficácia excelente. Isso é crucial, pois a resistência bacteriana, especialmente em biofilmes de *P. aeruginosa*, é um problema grave. O OEM e o extrato fúngico, com sua composição química complexa, podem ser mais vantajosos por terem múltiplos alvos de ação, o que dificulta o desenvolvimento de resistência pelas bactérias. A eficácia comparativa dos compostos foi demonstrada pelos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

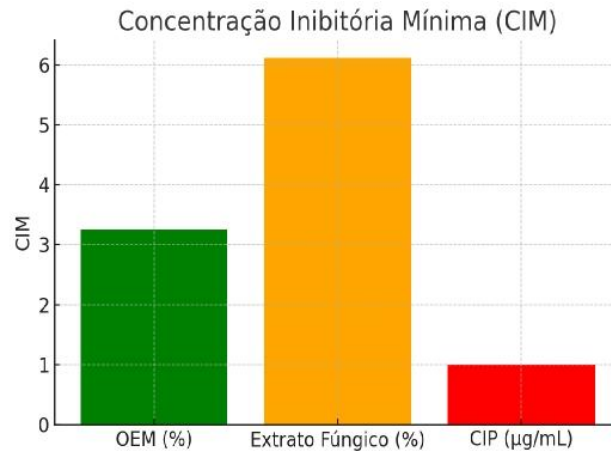


Fig. 6 – Valores CIM obtidos para o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (OEM), extrato fúngico de manguezal e ciprofloxacina (CIP) frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Fonte: Autor, 2025.

Com base nos resultados promissores dos testes iniciais, o estudo optou por focar no **óleo essencial de melaleuca (OEM)** e no **extrato fúngico** para os experimentos seguintes, especificamente contra a bactéria *P. aeruginosa*. A pesquisa demonstrou que o modelo de pele suína é viável tanto para simular a infecção bacteriana quanto para testar o tratamento.

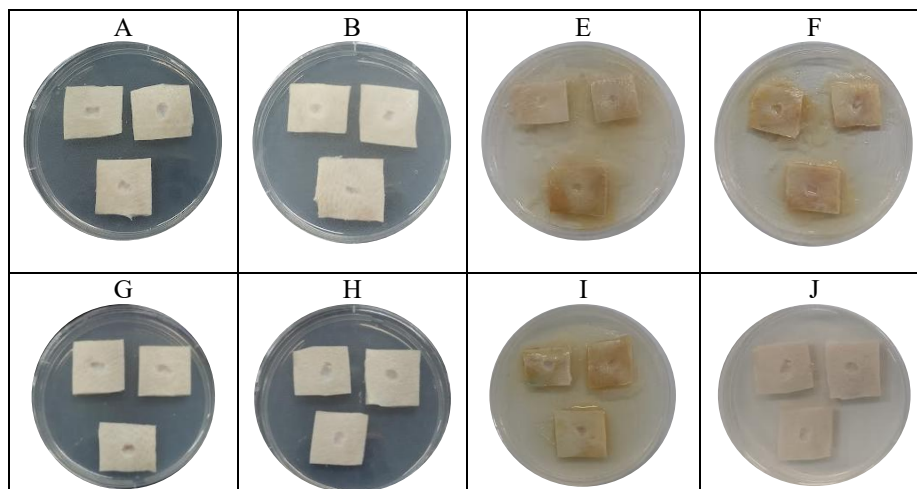


Fig. 7 – Fragmentos de pele suína. Em a, b, c e d observam-se fragmentos estéreis; em e, f e g esses fragmentos foram infectados por *P. aeruginosa*; em h observa-se o controle da ferida sem infecção. Fonte: Autor, 2025.

O tratamento de feridas de pele de porco com o óleo essencial de melaleuca (OEM) inibiu completamente o crescimento da bactéria *P. aeruginosa*, validando seu potencial terapêutico. O extrato fúngico de manguezal também reduziu significativamente o crescimento bacteriano. Esses resultados reforçam a eficácia do modelo *ex vivo* de pele suína como uma alternativa confiável e ética para pesquisas

(Roche *et al.*, 2019), já que sua estrutura e resposta imune são bastante similares às da pele humana (Summerfield *et al.*, 2015; Ranamukhaarachchi *et al.*, 2016)

Tabela 1. Comparação entre a pele humana e a pele suína para validação do modelo *ex vivo*.

<b>Característica</b>	<b>Pele Humana</b>	<b>Pele Suína</b>
Espessura da epiderme e derme	Epiderme fina e derme relativamente espessa	Arquitetura histológica semelhante
Estrutura em camadas	Epiderme, derme e tecido subcutâneo bem definidos	Organização equivalente, com pequenas variações regionais
Presença de folículos pilosos e glândulas	Folículos e glândulas distribuídos conforme a região corporal	Distribuição semelhante, com densidade próxima
Vascularização e inervação	Rede vascular e nervosa complexa, essencial para resposta inflamatória	Rede comparável, permitindo estudos de cicatrização e inflamação
Composição imunológica	Células imunes residentes (Langerhans, linfócitos, macrófagos, mastócitos)	Populações celulares equivalentes, desempenhando funções análogas
Barreira cutânea	Queratina + lipídios que limitam entrada de patógenos	Estrutura semelhante, com eficácia comparável
Resposta a infecções	Ativa resposta inflamatória e imune local	Comportamento equivalente em infecções bacterianas experimentais

Fonte: Autor, 2025 (Adaptado de Summerfield, 2015)

Então, obtivemos que o teste de microgotas confirmou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de melaleuca (OEM) e do extrato fúngico. O OEM impediu completamente o crescimento de colônias de *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto o extrato fúngico causou uma redução significativa. Em contraste, as amostras não tratadas mostraram um crescimento massivo da bactéria.

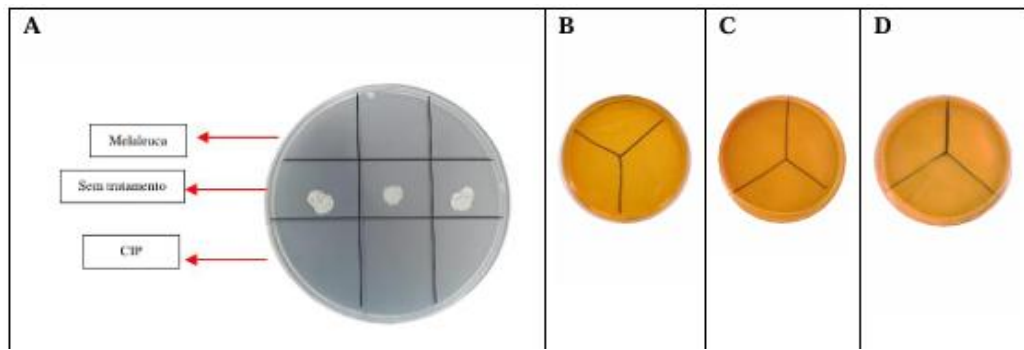


Fig. 8 - Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de melaleuca (OEM) e da Ciprofloxacina (CIP). A imagem mostra que ambos os tratamentos impediram o crescimento de colônias de *P. aeruginosa*, em contraste com o controle de infecção. Os controles de esterilidade confirmaram a ausência de contaminação. Fonte: Autor, 2025.

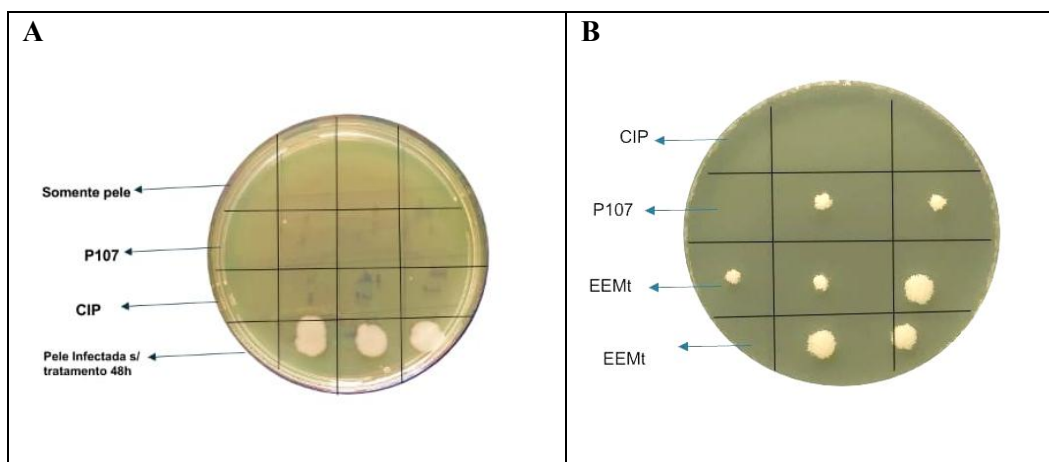


Fig. 9 - O ensaio de microgota confirmando a ausência de contaminação nos controles de esterilidade. A pele infectada sem tratamento revela um crescimento massivo de colônias de *Pseudomonas aeruginosa*. Após a aplicação, o extrato fúngico (P107) reduz significativamente o número de colônias. Fonte: Autor, 2025.

A Figura 11 resume em escala qualitativa os resultados obtidos no modelo *ex vivo*, destacando a diferença no crescimento bacteriano entre os controles e os tratamentos aplicados.

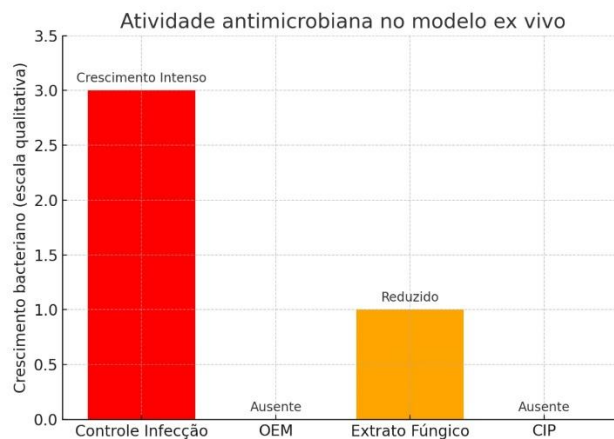


Figura 10 – Representação do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em pele suína infectada, comparando o controle sem tratamento com as amostras tratadas com óleo essencial de melaleuca (OEM), extrato fúngico de manguezal e Ciprofloxacina (CIP).  
Fonte: Autor, 2025.

Esse resultado reforça a efetividade dos produtos naturais em estudo frente a infecção estabelecida de *P. aeruginosa*, um achado altamente relevante, considerando a dificuldade de erradicação desse patógeno em contextos clínicos

## CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa demonstram o grande potencial antimicrobiano do **óleo essencial de melaleuca**, eficaz contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Em testes, ele inibiu o crescimento bacteriano de forma mais potente que o antibiótico ciprofloxacina e eliminou completamente as bactérias das feridas. O estudo também revelou que um **extrato fúngico de manguezal** tem potencial promissor, reduzindo significativamente o crescimento bacteriano. Esses achados reforçam a importância de buscar alternativas naturais para combater a crescente resistência aos antibióticos, indicando que compostos como a melaleuca e o extrato fúngico podem ser uma estratégia valiosa para o tratamento de infecções.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao **CNPq** pelo apoio financeiro, ao **IFMA MTC** e especialmente ao **LPBiotec**, e aos meus colegas de laboratório pela contribuição científica, fundamentais para o sucesso deste projeto.

## REFERENCIAS

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 29. ed. Supplement M100. Wayne, PA: CLSI, 2019.

GAJDÁCS, M.; URBÁN, E.; STÁJER, A.; BARÁTH, Z. Antimicrobial Resistance in the Context of the Sustainable Development Goals: A Brief Review. **European Journal of Investigation in Health, Psychology and Education**, v. 11, n. 1, p. 71–82, 2021.

RANAMUKHAARACHCHI, S. A.; LIU, Z.; WANG, H. A micromechanical comparison of human and porcine skin before and after preservation by freezing for medical device development. **Scientific Reports**, v. 6, p. 32074, 2016.

RAWSON, T. M.; MOORE, L. S. P.; ZHU, N.; RANGANATHAN, N.; SKOLIMOWSKA, K.; GILCHRIST, M.; SATTA, G.; COOKE, G.; HOLMES, A. Bacterial and Fungal Coinfection in Individuals with Coronavirus: A Rapid Review To Support COVID-19 Antimicrobial Prescribing. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 9, p. 2459–2468, 2020.

ROCHE, E. D.; WOODMANSEY, E. J.; YANG, Q.; GIBSON, D. J.; ZHANG, H.; SCHULTZ, G. S. Cadexomer iodine effectively reduces bacterial biofilm in porcine wounds ex vivo and in vivo. **International Wound Journal**, v. 16, n. 3, p. 674–683, 2019.

SOUSA, M. A. S.; FERREIRA, A. F.; SILVA, C. C.; SILVA, M. A.; BAZAN, T. A. X. N.; MONTEIRO, C. A.; MONTEIRO, A. S.; SOUSA, J. C. S.; SILVA, L. C. N.; ZAGMIGNAN, A. Development and Characterization of Hydroxyethyl Cellulose-Based Gels Containing Lactobacilli Strains: Evaluation of Antimicrobial Effects in In Vitro and Ex Vivo Models. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 3, p. 468, 2023.

SUMMERFIELD, A.; MEURENS, F.; RICKLIN, M. E. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. **Molecular Immunology**, v. 66, p. 14–21, 2015.

VILA NOVA, B. G.; SILVA, L. D. S.; ANDRADE, M. D. S.; SANTANA, A. V. S.; SILVA, L. C. T.; SÁ, G. C.; ZAFRED, I. F.; MOREIRA, P. H. A.; MONTEIRO, C. A.; SILVA, L. C. N.; ABREU, A. G. The essential oil of *Melaleuca alternifolia* incorporated into hydrogel induces antimicrobial and anti-inflammatory effects on infected wounds by *Staphylococcus aureus*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 173, 2024.

ZHOU, P.; LIU, Z.; CHEN, Y.; XIAO, Y.; HUANG, X.; FAN, X. Bacterial and fungal infections in COVID-19 patients: A matter of concern. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 41, n. 9, p. 1124–1125, 2020.