



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS

Daniela Aparecida Moreira

**Atividade desinfetante *in vitro* de nanocápsulas do óleo essencial de *Tagetes minuta* L.
para o manejo da ordenha**

Florianópolis
2021

Daniela Aparecida Moreira

**Atividade desinfetante *in vitro* de nanocápsulas do óleo essencial de *Tagetes minuta* L.
para o manejo da ordenha**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Agroecossistemas.

Orientadora: Prof.^a Shirley Kuhnen, Dr.^a

Co-orientadores: Prof., Luiz Carlos Pinheiro Machado Filho, Dr.; Prof. Luiz Filipe Damé Schuch, Dr.

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Moreira, Daniela Aparecida

Atividade desinfetante in vitro de nanocápsulas do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. para o manejo da ordenha / Daniela Aparecida Moreira; orientadora, Shirley Kuhnen, coorientador, Luiz Carlos Pinheiro Machado Filho, coorientador, Luiz Filipe Damé Schuch, 2021.

60 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Agroecossistemas. 2. Desinfetantes eco-friendly. 3. Nanocápsulas. 4. Pecuária sustentável. 5. Óleo essencial de *Tagetes minuta* L.. I. Kuhnen, Shirley. II. Pinheiro Machado Filho, Luiz Carlos. III. Damé Schuch, Luiz Filipe IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. V. Título.

Daniela Aparecida Moreira
**Atividade desinfetante *in vitro* de nanocápsulas do óleo essencial de *Tagetes minuta* L.
para o manejo da ordenha**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Shirley Kuhnen, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof.^a Daniele Cristina da Silva Kazama, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. João Luiz Zani, Dr.
Universidade Federal de Pelotas – UFPEL

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Agroecossistemas.

Prof. Arcângelo Loss, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas

Prof.^a Shirley Kuhnen, Dr.^a
Orientadora

Florianópolis, 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, meus pais e meu companheiro que literalmente “colocaram a mão na massa” comigo para que tudo acontecesse e à minha filha, que veio no meio dessa jornada trazendo alegria, leveza, suporte e amor em todos os momentos.

Ao Professor Luiz Carlos Pinheiro Machado (in memoriam) e aos amigos Omar Coré e Noemi H. Hecharri (Mimi) pelo incentivo em buscar a pós-graduação nesta área.

A minha Orientadora Prof.^a Dr.^a Shirley Kuhnen e aos meus Co-orientadores Prof. Dr. Luiz Carlos Pinheiro Machado Filho e Prof. Dr. Luiz Filipe Damé Schuch pelos ensinamentos, pela dedicação e auxílio nas atividades e pela maneira compreensiva e humana com que lidamos com os “eventos adversos” durante essa trajetória.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade de desenvolver o estudo.

Ao Laboratório de Bioquímica e Produtos Naturais (LABINAT) e às colegas Isadora, Gabriela, Karin e Bia, pelo suporte e convívio.

À Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e ao Laboratório de Saúde Coletiva (LASC), todos os colegas e em especial a colega e amiga Jackeline pela acolhida e pela oportunidade de realizar parte das atividades no LASC.

Ao Laboratório de Etologia Aplicada e Bem-Estar animal e todos os colegas pela recepção e convívio durante o Mestrado, em especial a Prof.^a Maria Jose Hötzel, Melissa, Guilherme, Fabiellen, Laura, Maria Júlia, Raphaela, Dario, Zimbábue, Rita, Ana, Francis e Juliana.

Ao Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) do Setor de Química Orgânica do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos e ao Laboratório de Química da Madeira do Centro de Engenharias, ambos da UFPel, pela disponibilização de seus equipamentos para extração do óleo essencial.

Por fim, a todos os amigos que estiveram presentes física, mental e espiritualmente, acompanhando, contribuindo e torcendo pelo meu crescimento em todos os sentidos.

Muito obrigada!

RESUMO

A desinfecção da pele dos tetos é um dos métodos preconizados para prevenção da mastite bovina, principal doença dos rebanhos leiteiros. Diversos desinfetantes estão disponíveis no mercado, incluindo à base de iodo, cloro e clorexidine. No entanto, além de agredirem a pele do teto dos animais, há registros da ocorrência de resíduos dos mesmos no leite e o desenvolvimento de resistência bacteriana, com implicações negativas à saúde humana e ao meio ambiente. Portanto, a busca por produtos eco-friendly seguros e eficazes que possam ser também usados nos sistemas de produção sustentáveis como o orgânico ou agroecológico tem se justificado. Neste sentido, as plantas medicinais destacam-se como alternativa tanto para o tratamento de enfermidades como para a desinfecção de superfícies. O óleo essencial de *Tagetes minuta* L., um subarbusto que cresce espontaneamente em áreas de cultivos anuais, é reconhecido pelas suas propriedades biocidas, incluindo antifúngica, antiparasitária e antimicrobiana. No entanto, dentre as limitações do seu uso estão o caráter lipossolúvel e volatilidade do óleo essencial. Desse modo, em estudo anterior o grupo de pesquisa do LABINAT (UFSC) propôs o desenvolvimento de nanocápsulas com o óleo essencial de *T. minuta* (NC-TM), visando garantir maior estabilidade, potencialidade e proteção dos compostos ativos. Com o intuito de dar continuidade a esses estudos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade desinfetante *in vitro* das NC-TM na ausência e presença de matéria orgânica e para a desinfecção de superfícies, i.e., borracha, cerâmica e inox visando o seu uso no manejo da ordenha. O óleo essencial foi obtido de populações naturais de *T. minuta* e extraído pela técnica de arraste a vapor. As nanocápsulas foram preparadas pela técnica de precipitação do polímero pré-formado. A atividade desinfetante *in vitro* foi avaliada segundo a Norma Padrão Europeia BS EN 1040:2005 com adaptações, frente às cepas padrão de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, após 5, 15 e 30 minutos de contato na ausência de matéria orgânica e 15 e 30 minutos na presença de matéria orgânica (leite) e nas superfícies. O óleo essencial apresentou, di-hidrotagetona, trans-tagetona, d-limoneno, trans- β -ocimeno e cis-tagetona como compostos majoritários, os quais representaram 95% da sua composição. As nanocápsulas (NC-TM) apresentaram características macroscópicas similares ao estudo anterior e o teor de óleo essencial encapsulado foi de $3,35 \pm 0,51\%$ (m/v). Frente a *P. aeruginosa*, as NC-TM (100 e 50%, v/v) reduziram o crescimento microbiano, na ausência de matéria orgânica, em 5 logs, nos 3 tempos de contato testados. Por outro lado, contra *S. aureus*, a mesma redução só foi obtida na maior concentração (100%, v/v) e após 15 e 30 min de contato. Na presença de matéria orgânica, a atividade desinfetante das NC-TM (100%, v/v) foi demonstrada somente frente a *P. aeruginosa*, bem como no teste desinfetante em superfícies. Os resultados obtidos evidenciaram o potencial de um produto natural associado a nanotecnologia em fase inicial de desenvolvimento que pode servir de alternativa para desinfecção de tetos no manejo de ordenha de vacas leiteiras, adequando práticas sustentáveis necessárias à produção de leite agroecológico e orgânico.

Palavras-chave: Desinfetante eco-friendly. Nanocápsulas. Pecuária sustentável. *T. minuta*. Óleo essencial.

ABSTRACT

Disinfection of the skin of the teats is one of the recommended methods to prevent bovine mastitis, the main disease of dairy herds. Several disinfectants are available on the market, including iodine, chlorine and chlorhexidine. However, in addition to attacking the skin of the animals' teats, there are records of the occurrence of animal residues in milk and the development of bacterial resistance, with negative implications for human health and the environment. Therefore, the search for safe and effective eco-friendly products that can also be used in sustainable production systems such as organic or agroecological has been justified. In this sense, medicinal plants stand out as an alternative both for the treatment of diseases and for the disinfection of surfaces. The essential oil of *Tagetes minuta* L., a sub-shrub that grows spontaneously in areas of annual crops, is recognized for its biocidal properties, including antifungal, antiparasitic and antimicrobial. However, among the limitations of its use are the fat-soluble character and volatility of the essential oil. Thus, in a previous study, the LABINAT research group (UFSC) proposed the development of nanocapsules with the essential oil of *T. minuta* (NC-TM), in order to ensure greater stability, potential and protection of the active compounds. In order to continue these studies, the present study aimed to evaluate the *in vitro* disinfectant activity of NC-TM in the absence and presence of organic matter and for the disinfection of surfaces, ie, rubber, ceramics and stainless steel, aiming its use in milking management. The essential oil was obtained from natural populations of *T. minuta* and extracted using the steam-distillation technique. The nanocapsules were prepared using the preformed polymer precipitation technique. The *in vitro* disinfectant activity was evaluated according to the European Standard Norm BS EN 1040:2005 with adaptations, against the standard strains of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, after 5, 15 and 30 minutes of contact in the absence of organic matter and 15 and 30 minutes in the presence of organic matter (milk) and on the surfaces. The essential oil presented dihydrotageton, trans-tageton, d-limonene, trans- β -ocimene and cis-tageton as major compounds, which represented 95% of the composition. The nanocapsules (NC-TM) presented macroscopic characteristics similar to the previous study and the encapsulated essential oil content was $3.35 \pm 0.51\%$ (m/v). Against *P. aeruginosa*, the NC-TM (100 and 50%, v/v) reduced microbial growth, in the absence of organic matter, in 5 logs, in the 3 contact times tested. On the other hand, against *S. aureus*, the same reduction was only obtained at the highest concentration (100%, v/v) and after 15 and 30 min of contact. In the presence of organic matter, the disinfectant activity of the NC-TM (100%, v/v) was demonstrated only against *P. aeruginosa*, as well as in the disinfectant test on surfaces. The results obtained showed the potential of a natural product associated with nanotechnology in the initial stage of development that can serve as an alternative for disinfecting teats in the handling of milking cows, adapting sustainable practices necessary for the production of agroecological and organic milk.

Keywords: Eco-friendly disinfectant. Nanocapsules. Sustainable livestock. *T. minuta*. Essential oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema geral da estrutura de nanoesferas e nanocápsulas.....	25
Figura 2 – Coleta, secagem e extração do óleo essencial de <i>T. minuta</i>	29
Figura 3 – Preparação das nanocápsulas com o óleo essencial de <i>T. minuta</i>	31
Figura 4 – Inox, cerâmica e borracha utilizadas no teste desinfetante em superfícies.....	34
Figura 5 – Aspecto macroscópico das nanocápsulas com o óleo essencial de <i>T. minuta</i>	39
Figura 6 – Ação desinfetante das nanocápsulas com óleo essencial de <i>T. minuta</i> , nas concentrações de 100% e 50% (v/v) frente às cepas padrão de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 e <i>S. aureus</i> ATCC 6538 após 5, 15 e 30 minutos de contato.....	40
Figura 7 – Ação desinfetante das nanocápsulas com o óleo essencial de <i>T. minuta</i> frente à cepa padrão de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 e <i>S. aureus</i> ATCC 6538 nos diferentes tempos de contato de 5, 15 e 30 minutos de contato.....	42
Figura 8 – Teste desinfetante com nanocápsulas do óleo essencial de <i>T. minuta</i> em superfícies de borracha, cerâmica e inox frente às cepas padrão de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 e <i>S. aureus</i> ATCC 6538 após 15 e 30 minutos de contato.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Categorização dos níveis de redução dos microrganismos pelos números de colônias presentes e o percentual de redução comparado ao inóculo.....	35
Tabela 2 – Composição química do óleo essencial de <i>T. minuta</i> coletada na região sul do Rio Grande do Sul (Brasil) nos meses de junho e julho de 2019.....	37
Tabela 3 – Teor médio* de óleo essencial de <i>T. minuta</i> nas nanocápsulas.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC American Type Culture Collection (Coleção Americana de Tipos de Culturas)
CBF Contagem Bacteriana Final
CBI Contagem Bacteriana Inicial
CCS Contagem de Células Somáticas
CEN Comitê Europeu de Padronização
CIM Concentração Inibitória Mínima
CPP Contagem Padrão em Placa
IC50 Concentração Inibitória 50%
IIPa Índice de Inibição Pseudomonas aeruginosa
IISa Índice de Inibição Staphylococcus aureus
IN Instrução Normativa
IRed Índice de Redução
LABINAT Laboratório de Bioquímica e Produtos Naturais
LASC Laboratório de Saúde Coletiva
LOG Logaritmo
MAC-T Mammary Alveolar Cell-T (Células Alveolares Mamárias T)
MAPA Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
NC-TM Nanocápsulas a base de óleo essencial de T. minuta
OIE World Organisation for Animal Health
PCL Poli- ϵ -caprolactona
S Sul
TSA Tryptic Soy Agar
UFC Unidade Formadora de Colônias
UFPel Universidade Federal de Pelotas
UFSC Universidade Federal de Santa Catarina
W Oeste

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	HIPÓTESE DO ESTUDO	17
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
4.1	MASTITE BOVINA	18
4.2	QUALIDADE DO LEITE E MÉTODOS DE DESINFECÇÃO	19
4.3	SOLUÇÃO À BASE DE PLANTAS	21
4.4	<i>Tagetes minuta</i> L.	22
4.5	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	23
4.6	NANOFORMULAÇÕES.....	24
5	MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1	<i>Tagetes minuta</i>	28
5.1.1.	Extração do óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i>	28
5.1.2	Caracterização química do óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i>	29
5.2	PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS.....	30
5.3	ATIVIDADE DESINFETANTE DAS NANOCÁPSULAS.....	32
5.3.1	Teste desinfetante padrão	32
5.3.2	Teste desinfetante com matéria orgânica	33
5.3.3	Teste desinfetante em superfícies	33
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
7.1	ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Tagetes minuta</i>	37
7.2	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS.....	38
7.3	ATIVIDADE DESINFETANTE DAS NANOCÁPSULAS.....	40
7.3.1	Teste desinfetante padrão	40

7.3.2	Teste desinfetante com matéria orgânica	42
7.3.3	Teste desinfetante em superfícies	43
8	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS.....	47
	ANEXO A - Certidão do cadastro de acesso no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado.....	59

1 INTRODUÇÃO

Dentre as atividades agropecuárias, o setor leiteiro é um dos que está em constante crescimento. Por ser uma linha primária na produção de alimentos, é mantida majoritariamente em países em desenvolvimento por pequenos e médios produtores, representando para os mesmos uma fonte de renda mensal (CONAB, 2017; JUNG & JÚNIOR, 2017).

Uma das etapas desafiadoras na pecuária leiteira é a sanidade do rebanho e do ambiente. Os manejos produtivos e mais especificamente o de ordenha, exigem métodos eficientes de desinfecção dos equipamentos, das instalações e principalmente dos tetos das vacas. Tais medidas são importantes para prevenir o contágio dos animais com microrganismos responsáveis pela ocorrência da principal enfermidade de rebanhos leiteiros, a mastite. A mastite é uma doença plurietiológica e multifatorial caracterizada pela inflamação da glândula mamária, que além de gerar prejuízos aos produtores, reduz a quantidade e a qualidade do leite e também altera o quadro de bem-estar do animal (FOGSGAARD et al., 2015).

Considerando a demanda por produtos diferenciados no que diz respeito ao modelo tecnológico, com uso de insumos renováveis, muitos trabalhos vêm buscando por métodos alternativos no tratamento dessa e de outras doenças. Um exemplo é a busca de novas opções terapêuticas nas plantas, as quais possuem propriedades importantes na medicina veterinária (ABBAS et al., 2018; CHANDRA et al., 2017; GARCÍA-SALINAS et al., 2018).

Além dos produtos existentes no mercado, é crescente a demanda da sociedade pelo uso de alternativas mais sustentáveis e viáveis do ponto de vista econômico e ambiental (ORGANIS, 2017). Ainda, o desenvolvimento de microrganismos resistentes aos produtos atuais é preocupante e coloca em risco não só a sanidade dos rebanhos como também a saúde pública (OIE, 2020; WATTS & SWEENEY, 2010). Assim, produtos eco-friendly, que são alternativas que unem tecnologia e conhecimento tradicional associados às plantas principalmente, estão em crescente demanda de desenvolvimento e utilização, inclusive no meio agropecuário, buscando a redução de resíduos prejudiciais ao meio ambiente (MAES, BOUQUILLON & FAUCONNIER, 2019; PAVELA & BENELLI, 2016; PINHEIRO MACHADO et al., 2020).

Com intuito de propor alternativas para desinfecção de superfícies, incluindo a superfície da pele do teto de vacas leiteiras, o presente trabalho traz à tona o uso de plantas com características desinfetantes e antimicrobianas. Há diversos exemplos na literatura como *Senna macranthera*, *Artemisia absinthium*, *Cymbopogon nardus*, *Achyrocline satureioides*,

Eucalyptus ssp, *Baccharis trimera* e *Tagetes minuta* (BOTH et al., 2016; DIAZ et al., 2010; SANTOS et al., 2017; SCHUCH et al., 2007). As propriedades antimicrobianas já foram demonstradas tanto para plantas in natura, como para extratos e óleos essenciais (GARCÍA-SALINAS et al., 2018). Dentre essas, destaca-se a planta *T. minuta* L., originária do México, pertence à família Asteraceae ou Compositae e cresce espontaneamente na região sul do Brasil nos meses de primavera e verão (MOREIRA, 1996). É um subarbusto pouco ramificado, ereto e com odor característico. Possui pequenas flores amarelas, e pode atingir até 2 metros de altura, sendo conhecida popularmente pelo nome de “chinchilho” ou “cravo-de-defunto” (KISSMANN & GROTH, 1992; SCHIAVON et al., 2015).

Tanto o extrato como o óleo essencial de *T. minuta* são reconhecidos pelas suas propriedades antifúngica, antioxidante, antiinflamatória, citotóxica, carrapaticida, larvicida e antimicrobiana (ALI et al., 2014; ANDREOTTI et al., 2014; AVANCINI & WIEST, 2000; IBRAHIM et al., 2018; KUMAR, PANDEY & VARSHNEY, 2019; SANTOS et al., 2017; SOUZA,). No entanto, de maneira geral, a aplicação de óleo essencial apresenta diversas limitações, dentre elas a sua volatilidade. Desse modo, a associação com a nanotecnologia representa uma alternativa que pode melhorar a estabilidade, funcionalidade e potencialidade do produto em questão (ANWER et al., 2014). A nanotecnologia facilita, por exemplo, a aplicabilidade de compostos hidrofóbicos que poderão ser usados em diversas formas como spray, cremes e espuma. Também tem a vantagem do uso de menores concentrações e consequente redução de custo e risco de toxicidade. Ainda, podem ser citadas como vantagens a proteção do óleo essencial de instabilidades térmicas, de volatilização, propiciando a dissolução e estabilização dos seus princípios ativos (BAJERSKI et al., 2016; BOUCHEMAL et al., 2004; CONSTANTINIDES, CHAUBAL & SHORR, 2008;).

Neste sentido, o grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Produtos Naturais (LABINAT) da Universidade Federal de Santa Catarina tem se dedicado a desenvolver sistemas nanoestruturados contendo produtos naturais com aplicação na medicina veterinária, incluindo nanopropolis (PINHEIRO MACHADO et al., 2019), nanoemulsão com o óleo essencial do alecrim do campo (SEUGLING et al., 2019), nanomacela (PINHEIRO MACHADO et al., 2020) e nanocápsulas com o óleo essencial de *T. minuta* (BOLZAN, 2018).

Em um primeiro estudo, a ação antimicrobiana do óleo essencial de *T. minuta* contra *S. aureus* de leite mastítico foi demonstrada (SPERANDIO et al., 2019). No entanto, sua elevada citotoxicidade frente a células epiteliais mamárias bovinas da linhagem MAC-T foi encontrada. Em estudo subsequente, nanocápsulas com este óleo essencial foram

desenvolvidas, as quais mostraram atividade antimicrobiana similar e citotoxicidade inferior as do óleo essencial (BOLZAN, 2018). Sendo assim, devido a citotoxicidade elevada a moderada das nanocápsulas com o óleo essencial de *T. minuta* (NC-TM), o presente trabalho teve como objetivo investigar o uso externo, i.e., na desinfecção das superfícies presentes em ambientes de ordenha, visando seu uso no manejo dos rebanhos leiteiros.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade desinfetante *in vitro* de nanocápsulas do óleo essencial de *T. minuta* L. visando o uso no manejo da ordenha.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vitro* a atividade desinfetante das nanocápsulas do óleo essencial de *T. minuta* L. contra as cepas *P. aeruginosa* (ATCC 15442) e *S. aureus* (ATCC 6538) conforme a metodologia descrita na Norma Europeia BS EN 1040:2005.

- Avaliar *in vitro* a atividade desinfetante das nanocápsulas do óleo essencial de *T. minuta* L. contra as cepas *P. aeruginosa* (ATCC 15442) e *S. aureus* (ATCC 6538), com adição de leite ao teste, simulando a presença de matéria orgânica como desafio ao produto.

- Avaliar *in vitro* a atividade desinfetante das nanocápsulas do óleo essencial de *T. minuta* L. contra as cepas *P. aeruginosa* (ATCC 15442) e *S. aureus* (ATCC 6538), em três diferentes superfícies, i.e., borracha, cerâmica e inox, as quais são encontradas com frequência em ambientes de ordenha.

3 HIPÓTESE DO ESTUDO

As nanocápsulas contendo o óleo essencial de *T. minuta* L. tem eficácia desinfetante incluindo na presença de matéria orgânica e quando usadas em superfícies encontradas no ambiente da ordenha, com potencial de aplicação no pós-dipping e higienização do ambiente.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 MASTITE BOVINA

A mastite é uma enfermidade multifatorial caracterizada pela inflamação da glândula mamária podendo ou não apresentar sinais clínicos. É classificada em mastite clínica ou subclínica e contagiosa ou ambiental, dependendo da apresentação de sinais clínicos e do agente causador da doença. Além da queda na produção de leite, causada por lesões aos tecidos epiteliais mamários e os custos com tratamentos, a mastite é uma enfermidade plurietiológica que afeta diretamente o bem-estar dos animais mesmo antes do seu diagnóstico ou após o término do tratamento com antibióticos, os quais são geralmente pouco eficazes (FOGSGAARD et al., 2015).

Essa enfermidade afeta a qualidade do leite, associada a contagens bacterianas aumentadas no produto, que alteram componentes como gordura e proteínas, reduzindo a vida útil do mesmo após os procedimentos de industrialização ou até mesmo inviabilizando o seu processamento (BARBANO, MA & SANTOS, 2006; BORNEMAN & INGHAM, 2014). A contagem padrão em placa (CPP) e a contagem de células somáticas (CCS) estão relacionadas à higienização dos tetos, equipamentos e estado sanitário da glândula mamária, respectivamente. Tais parâmetros como a CCS são também utilizados para o diagnóstico da mastite subclínica e ambos são considerados no pagamento e bonificações aos produtores sobre a qualidade do leite (BAUMBERGER, GUARIN & RUEGG, 2016; GLEESON, O'CONNELL & JORDAN, 2013).

Dentre os agentes de importância sanitária, *S. Aureus* se destaca como principal agente infeccioso causador da mastite. É também um colonizador da superfície do teto e tem potencial para aumentar em até 3,3 vezes a chance de infecção intramamária nesta condição. (BAUMBERGER, GUARIN & RUEGG, 2016; GIBSON et al., 2008; GLEESON et al., 2009; OLIVER et al., 2001; OLIVER et al., 1993; PANKEY, WILDMAN & DRECHSLER, 1987 ROBERSON et al.,1994;).

Além de *S. aureus*, outros organismos de importância sanitária são os patógenos *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae*, que mesmo tendo nos últimos anos a redução na incidência de mastite contagiosa causada por eles, continuam como importantes agentes. Os patógenos ambientais, como *Escherichia coli* e *Streptococcus uberis*, também são

preocupações no que diz respeito a ocorrência de mastite (KEANE et al., 2013; MORTON et al., 2014).

Os *Enterococcus* que são cocos gram-positivos encontrados no trato gastrointestinal de animais, também contaminam o leite através de fezes, cama, sujidades do úbere, equipamentos de ordenha e tanques de armazenamento a granel mal higienizados (GARVEY, CURRAN & SAVAGE, 2016; HAMMAD, HASSAN & SHIMAMOTO, 2015). As bactérias gram-negativas estão presentes em casos de mastite ambiental nos rebanhos leiteiros e esses agentes ambientais são responsáveis por cerca de 40% dos quadros com sinais clínicos (AGUAYO et al., 2020; ANGELOPOULOU et al., 2019; SCHUKKEN et al., 2012).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa e sua prevalência em mastite subclínica encontrada em rebanhos na Índia, um dos maiores produtores mundiais de leite, é entre 5 e 10% (ANGELOPOULOU et al., 2019; BANERJEE et al., 2017). Além disso, há o problema de que as infecções causadas por *Pseudomonas* são umas das mais refratárias ao uso de antibióticos (AGUAYO et al., 2020; PARK et al., 2014).

Após a instalação de quadros de mastite clínica ou subclínica no rebanho, os tratamentos são basicamente feitos com antibióticos, sejam eles sistêmicos ou intramamários. Este último, geralmente é realizado como terapia da vaca seca, para tratamento da mastite subclínica. Contudo, estes tratamentos nem sempre tem eficácia adequada, seja pela sua má execução ou mesmo pelo desenvolvimento de resistência dos microrganismos aos produtos utilizados (PINHEIRO MACHADO, et al., 2019; SHARMA et al., 2018; ZHANG et al., 2020). Desse modo, ressalta-se a importância de qualificar os processos básicos de higiene na unidade de produção, reduzir a carga microbiana nas superfícies presentes no manejo da ordenha, como em equipamentos, utensílios e a própria pele do teto. Esta prática serve não só como garantia da qualidade do leite, mas principalmente como método de prevenção das infecções intramamárias, tornando ela uma aliada na promoção da qualidade do produto final, do bem estar animal, na redução dos custos econômicos e nas questões ambientais, principalmente no que se refere à questões de saúde coletiva.

4.2 QUALIDADE DO LEITE E MÉTODOS DE DESINFECÇÃO

Para limitar o número de contaminantes bacterianos no leite são necessárias práticas higiênicas eficientes nas superfícies em geral e onde possa haver contato com o mesmo. Isso proporciona uma carga bacteriana inicial baixa, que associada a refrigeração adequada do

produto se mantém até que o mesmo seja processado. No caso das exigências para qualidade do leite cru, os valores de CCS são até 500.000 células/mL e CPP até 300.000 UFC/mL (BRASIL, 2018). No entanto, estas exigências formalizadas na legislação só serão alcançadas quando o manejo higiênico-sanitário do rebanho for um fato consolidado dentro das propriedades (GARVEY, CURRAN & SAVAGE, 2016; GLEESON, O'CONNELL & JORDAN, 2013). Caso contrário, os produtores terão sérias dificuldades em adequar-se a tais demandas.

Há anos a adoção do dipping, que consiste na utilização de práticas e/ou produtos para higienização da pele do teto antes e depois da ordenha, vem sendo adotada na produção leiteira reduzindo as contagens bacterianas estafilocócicas e estreptocócicas. Reduz também a possibilidade de transferência bacteriana entre vacas durante a ordenha e após o manejo (GLEESON, FLYN, & O'BRIEN, 2018; KUMAR et al., 2012), e é uma prática relativamente pouco onerosa em comparação à necessidade de um tratamento, por exemplo, em caso de ocorrência de mastite.

Existem diversas opções de desinfetantes para o pré e pós-dipping no mercado. No entanto, o uso de produtos à base de iodo, cloro, clorexidine, amônia quaternária, entre outros, podem acarretar em consequências negativas como agressão à pele do teto, resíduos no leite em níveis inaceitáveis e no desenvolvimento de resistência microbiana a esses produtos (GADEA et al., 2017; LU et al., 2015; O'BRIEN, GLEESON & JORDAN, 2013).

A busca por desinfetantes se baseia em alguns critérios como a eficácia germicida, a persistência de ação, a prevenção de novas infecções e manutenção das condições adequadas da pele e esfíncter do teto, já que esta é uma das principais barreiras contra as infecções (LAGO et al., 2016).

Pele ressecada e com rachaduras proporciona condições para multiplicação de microrganismos e infecção intramamária devido à dificuldade de higienização desta superfície. Da mesma forma, possibilita a entrada de microrganismos na glândula mamária, pois logo após a ordenha o esfíncter do teto permanece aberto por um período de 20 a 30 minutos (BLOWEY & EDMONDSON, 2010). Por isso, é recomendado que se adote a prática do “dipping” principalmente no pós ordenha, focando na prevenção da mastite (BARLOW, ZADOKS & SCHUKKEN, 2013; VAN DEN BORNE et al., 2019).

O desenvolvimento de alternativas que sejam eficientes contra microrganismos, tanto para redução de carga microbiana como para prevenção de novas infecções intramamárias é necessário para além do custo econômico com a qualidade do leite. Os tratamentos com

antimicrobianos estão em debate na sociedade, já que a antibioticoterapia também tem custos à saúde pública (GROUT et al., 2020). A utilização de medicamentos de forma equivocada promove o desenvolvimento de microrganismos resistentes aos princípios ativos utilizados e esta é uma questão importante também na medicina veterinária (OIE, 2020; WATTS & SWEENEY, 2010; ZHANG et al., 2020).

A resistência microbiana direta ou indireta, promovida pelo uso de produtos, mesmo comprovadamente eficazes, como desinfetantes a base de amônia quaternária, por exemplo (GADEA et al., 2017; MÁRQUEZ et al., 2017; OBLAK, FUTOMA-KOŁOCH & WIECZYŃSKA, 2021), é crescente e preocupante, e aos poucos as alternativas vão se limitando.

Assim, o controle das enfermidades, principalmente da mastite, em um rebanho leiteiro segue sendo um desafio nos sistemas de produção. No que se refere a produção orgânica, este é ainda maior devido a limitação do uso de antimicrobianos e a falta de desenvolvimento de alternativas adequadas às normativas que norteiam esse tipo de produto – Instrução Normativa (IN46) (BRASIL, 2011). Portanto a busca por novas opções é urgente e necessária, e nas plantas, temos um enorme potencial em encontrar novos compostos bem como matrizes complexas que parecem dificultar o desenvolvimento de resistência (SANTANA et al., 2012).

Para além dos benefícios, a redução de danos ao meio ambiente também é uma característica importante destes produtos. Ao utilizar uma substância de base natural, ou seja, com compostos que são oriundos da própria natureza, estes por sua vez podem ser novamente incorporados ou reintroduzidos a ela sem causar danos ou desequilíbrios, considerando que todos processos e produtos utilizados na pecuária leiteira, por exemplo, em algum momento retornam ao meio ambiente (ZHANG et al., 2021).

4.3 SOLUÇÃO À BASE DE PLANTAS

A utilização de plantas para diversos fins, como perfumaria, condimentos, repelentes e o próprio uso terapêutico vem sendo realizada desde sempre por diversas comunidades, principalmente indígenas, quilombolas e não menos significativo, por comunidades rurais. Estas populações encontravam e encontram ainda hoje na fitoterapia uma alternativa mais viável e segura de manter os cuidados com a saúde do seu corpo e do ambiente em que vivem. Fazendo o uso das plantas no tratamento de enfermidades e na desinfecção de superfícies,

tornaram essa uma prática muito utilizada e reconhecida (BOTH et al., 2016; CHANDRA et al., 2017; FONSECA, 2018; MARINHO et al., 2007).

Este conhecimento na área de plantas medicinais se deve principalmente à acessibilidade e confiança nesta terapia, adquiridas de forma inicialmente empírica que vem sendo cada vez mais objeto de diferentes estudos científicos (CHANDRA et al., 2017; MARINHO et al., 2007; PINHEIRO MACHADO et al., 2020). Como as populações, desde que domesticaram o primeiro animal, convivem próximas a diversas espécies deles, o uso da fitoterapia está presente também na medicina veterinária, tanto na prevenção como no tratamento terapêutico de enfermidades causadas por microrganismos ou parasitas. Nestes casos, podem ser utilizadas a planta inteira, seus compostos isolados ou em conjunto, na forma de decocto, extratos ou óleos essenciais (ABBAS et al., 2018; GARCÍA-SALINAS et al., 2018).

As ações antimicrobiana, desinfetante, antifúngica, antiparasitária e muitas outras voltadas a produção animal das plantas medicinais vem sendo estudadas por diferentes autores (AVANCINI & WEST, 2008; MATOS, 2014; SCHUCH et al., 2008; SEUGLING et al., 2019; SPERANDIO et al., 2019). Estes trabalhos buscam esclarecer os desafios, e consolidar as oportunidades e perspectivas da atividade antimicrobiana destas plantas como soluções alternativas para produção e inclusive no combate à resistência antimicrobiana em humanos e animais (DILBATO, BEGNA & JOSHI, 2019).

4.4 *Tagetes minuta* L.

Dentre as diversas plantas já estudadas por suas características biocidas se destaca a *T. minuta*. Esta espécie que atualmente tem distribuição mundial é originária da América Central. Na região sul do Brasil, cresce espontaneamente em áreas de cultivos anuais, sendo considerada uma planta indicadora. É uma planta aromática e de pequeno porte, com poucas ramificações, ereta e com pequenas flores amarelas em forma de capítulos, que fazem referência à espécie “minuta”. Sua multiplicação se dá por sementes e seu ciclo varia de 120 a 180 dias. (KISSMANN & GROTH, 1992; LOVATTO, SCHIEDECK & MAUCH, 2013; SCHIAVON et al., 2015). No conhecimento tradicional tem muitos nomes como chinchilho, cravo-de-defunto, rojão, picão do reino, chinchila, manzanilla de la sierra e outros nomes populares (LORENZI & MATOS, 2002). É amplamente conhecida e utilizada na medicina popular por possuir atividades antiinflamatória, antifúngica, antimicrobiana, repelente, diurética e entre

tantas outras. Seu uso é feito também para tratamentos de afecções respiratórias, gastrointestinais e cutâneas (GOMES, 2017; LORENZI & MATOS, 2002; SANTOS et al., 2017).

Seu óleo essencial é rotineiramente extraído por hidrodestilação ou arraste a vapor e o rendimento é cerca de 1% (m/v), uma quantidade relativamente significativa, quando consideradas as partes da planta das quais se extrai o óleo (folhas, flores e pequenos caules). É utilizada popularmente para diversas finalidades medicinais, inclusive na medicina veterinária. (BOLZAN, 2018; SANTOS et al., 2017; SILVA et al., 2016; SPERANDIO et al., 2019). *T. minuta* já foi testada em suas mais diversas apresentações. Seu decocto, bem como o extrato e o óleo essencial foram testados como antimicrobiano frente a microrganismos de interesse na produção leiteira (OLANDA et al., 2019; SPERÂNDIO et al., 2019). Ao óleo essencial, a atividade acaricida já foi demonstrada (ANDREOTTI et al., 2013; SILVA et al., 2016). A ação desinfetante do extrato e do óleo essencial também foi evidenciada em comparação a outros desinfetantes comerciais (BOLZAN, 2018; SCHUCH et al., 2008).

Todas essas informações mostram o potencial da espécie, principalmente do óleo essencial, como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de produtos simples ou associados a tecnologias capazes de potencializar sua ação e facilitar sua manipulação no manejo da ordenha e prevenção da mastite bovina.

4.5 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são substâncias líquidas lipossolúveis, solúveis em solventes orgânicos, voláteis, geralmente lípidos e com densidade menor do que a água. Podem ter características químicas distintas que variam de acordo com o local, época de coleta e estágio vegetativo da planta. São misturas complexas que podem conter cerca de 20 a 60 compostos, sendo geralmente 2 ou 3 deles majoritários (ANGIONI et al., 2006; BILIA et al., 2014; GARCIA-SALINAS et al., 2018; SELL, 2010).

Estes compostos são terpenóides, fenilpropanóides e derivados de hidrocarbonetos de baixo peso molecular. Apesar de ser usual a realização da caracterização dos óleos essenciais a partir de seus compostos majoritários, é fundamental considerar a presença e função dos demais componentes, presentes em quantidades menores. É de conhecimento que estes são importantes para as atividades biológicas desempenhadas pelo óleo, principalmente devido ao sinergismo

dos diferentes compostos químicos (BILIA et al., 2014; GAKUUBI et al., 2016; LANGEVELD, VELDHUIZEN & BURT, 2014).

O óleo essencial de *T. minuta* é normalmente extraído por métodos de hidrodestilação ou arraste a vapor (ALI et al., 2014; BOLZAN, 2018). Apresenta odor característico e coloração geralmente amarelo-esverdeada e pode apresentar uma variedade de combinações majoritárias de compostos químicos, devido a fatores como utilização de secagem das plantas. Há relatos de que plantas frescas possuem maiores quantidades de (*Z*)-tagetona, limoneno e alvimeno, enquanto as plantas secas, tem maiores quantidades de di-hidrotagetona (SALEHI et al., 2018). Pode variar também com a localidade, estágio vegetativo da planta e sítios de produção como folhas ou flores (FONSECA, 2018; GAKUUBI et al., 2016; GOMES, 2017; MINISTÈRIO DA SAÚDE, 2015).

Apesar da ampla utilização dos óleos essenciais na medicina veterinária (GARCÍA-SALINAS et al., 2018), o seu uso ainda é limitado principalmente pelos fatores da dificuldade de aquisição e de utilização em grandes quantidades bem como as características de volatilidade e baixa solubilidade em água, o que reduz suas alternativas de apresentação como produto (ARAÚJO et al., 2015; DONSI & FERRARI, 2016). Desta forma, tecnologias que possibilitem melhorar a utilização destes compostos são necessárias e estão em expansão.

4.6 NANOFORMULAÇÕES

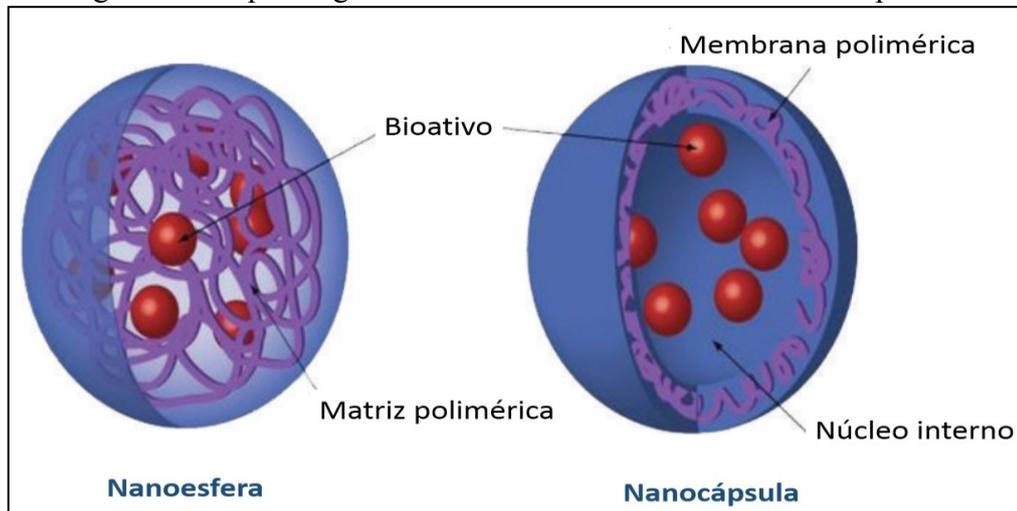
A nanotecnologia vem sendo amplamente utilizada pelas indústrias farmacêutica, dermocosmética, alimentar e também no meio agrícola, como método de melhorar a eficiência e aplicabilidade de compostos ativos nestes meios. Engloba o estudo e desenvolvimento de materiais em escala manométrica de 10 – 100 nanômetros (YOUSSEF et al., 2019), nanomateriais, materiais nanoestruturados, nanopartículas em nanoescala, nanosistemas e nanoprodutos (ALBERTI et al., 2019; BAHAMOND-NORAMBUENA et al., 2015; BILIA et al., 2014; DONSI & FERRARI, 2016; TRONCARELLI et al., 2013).

Uma das principais características de superioridade das nanopartículas em relação aos materiais de massa é a grande proporção de superfície por volume que elas apresentam, ou seja, há uma maior área de contato de um determinado componente e com isso aumenta também sua capacidade de ação. Além disso, a capacidade de liberação gradual e direcionada para locais específicos de chegada de um composto são também muito relevantes (MOHANRAJ & CHEN, 2006; YOUSSEF et al., 2019).

Os métodos de encapsulamento de partículas podem produzir micelas, nanopartículas poliméricas, nanoemulsões e lipossomas (SÃO PEDRO et al., 2013). Essas técnicas vêm como alternativa para contornar as limitações de uso dos óleos essenciais, por exemplo, e possibilitar melhor eficiência na sua aplicação. Utilizando sistemas coloidais nanométricos e nanocarreadores como sistemas coloidais poliméricos e lipídicos se conseguem vantagens como aumento da estabilidade físico química, menor toxicidade, melhora na permeabilidade dos compostos em células alvo e solubilidade de compostos lipofílicos em meio aquoso. Isso faz com que esta tecnologia seja promissora para aprimorar o uso de produtos naturais (CHUESIANG et al., 2019; MANGALE et al., 2015; SÃO PEDRO et al., 2013).

As nanopartículas poliméricas são dispersões particuladas ou partículas sólidas de sistemas carreadores, preparadas a partir de polímeros biodegradáveis, onde o composto bioativo é dissolvido, aprisionado, encapsulado ou conectado a uma matriz de nanopartículas. Podem ser nanoesferas com sistema matricial, onde redes poliméricas incorporam as moléculas bioativas em sua parede ou núcleo, ou podem ser nanocápsulas, que se apresentam em sistema reservatório, carregando o bioativo em um núcleo oleoso contido em uma estrutura polimérica vesicular (Figura 1) (ALBERTI et al., 2017; EL-SAY & EL-SAWY, 2017; TRONCARELLI et al., 2013).

Figura 1 – Esquema geral da estrutura de nanoesferas e nanocápsulas.



Fonte: Adaptado de Christoforidis et al. (2012).

Nanocápsulas são bastante utilizadas uma vez que melhoram a estabilidade química dos compostos ativos e reduzem a volatilização dos mesmos, aumentando a sua atividade. Além disso, as nanocápsulas são facilmente incorporadas em cremes e géis o que otimiza seu uso (SÃO PEDRO et al., 2013; SILVA, 2019).

Dentre os polímeros utilizados na preparação das nanocápsulas, a poli- ϵ -caprolactona (PCL) apresenta algumas vantagens como a biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas, tornando esse o polímero mais utilizado neste processo (GUTERRES, ALVES & POHKMANN, 2007; PINTO et al., 2016).

O método de preparação que mais se destaca é baseado na precipitação de polímeros pré-formados: nanoprecipitação ou deposição interfacial do polímero pré-formado e deslocamento de solvente, que consiste em adicionar uma fase orgânica em uma fase aquosa sob agitação magnética, resultando em uma emulsificação espontânea, com posterior evaporação do solvente. É considerado um método simples e rápido, facilmente replicável e por isso amplamente utilizado (EL_SAY & EL-SAWY, 2017; FESSI et al., 1989; SILVA, 2019).

O desenvolvimento de nanossistemas com óleos essenciais utilizando esta técnica está cada vez mais em evidência, a exemplo Silva et al. (2019), utilizou óleo essencial de *Lippia alba*, preparando suspensões nanoencapsuladas e comprovando sua ação larvicida frente a larvas de *Aedes aegypti*. Em outro trabalho, ficou demonstrada eficácia antimicrobiana e desinfetante de nanocápsulas contendo carvacrol, presente nos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare L.*) e tomilho (*Thymus vulgaris L.*), frente a microrganismos como *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* (CACCIATORE et al., 2020).

Na medicina veterinária os nanoproductos também vem sendo estudados (EL-SAYED & KAMEL, 2020; SEVEN et al., 2018; TRONCARELLI et al., 2013). De forma similar, nanocápsulas do óleo essencial de *T. minuta* foram desenvolvidas em um estudo anterior pelo grupo de pesquisa do LABINAT (UFSC) (BOLZAN, 2018). Inicialmente, a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *T. minuta* frente a microrganismos de interesse na produção leiteira, como *Escherichia coli* e *S. aureus*, incluindo uma cepa multirresistente foi demonstrada. No entanto, foi encontrada elevada toxicidade para o óleo em células epiteliais mamárias bovinas da linhagem MAC-T, sugerindo cautela para uso interno (SPERANDIO et al., 2019). Dessa forma, o grupo propôs o desenvolvimento de nanocápsulas à base deste óleo essencial, com o intuito de potencializar sua ação e possibilitar a redução da concentração utilizada, obtendo um produto com menor citotoxicidade e igual ou melhor atividade antimicrobiana.

As nanocápsulas foram desenvolvidas pelo método de precipitação do polímero pré-formado, seguido da evaporação de solvente e apresentaram características físico-químicas satisfatórias, com um percentual de óleo encapsulado de 2,9% (m/v). Na avaliação antimicrobiana, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi 1,429 mg/mL do óleo essencial

encapsulado e na avaliação de citotoxicidade a IC50 (Concentração Inibitória de 50%) foi 0,2875 mg/mL de óleo essencial. Tais resultados evidenciaram que mesmo menor quando comparada ao trabalho de Sperandio et al. (2019) com o óleo essencial não encapsulado, a citotoxicidade das nanocápsulas ainda foi alta, limitando a sua proposição como produto para uso intramamário (BOLZAN, 2018).

Ainda no estudo de BOLZAN (2018), a eficácia das nanocápsulas à base deste óleo essencial de *T. minuta* foi avaliada utilizando-se a Norma Padrão Europeia EN 1040 (2005). Uma redução de 5 logs da densidade populacional de *S. aureus* foi obtida após 30 e 60 minutos de contato com o produto puro e após 60 minutos com o produto diluído (50%). Já frente a *P. aeruginosa*, os resultados satisfatórios foram alcançados com o produto puro após os três tempos de contato testados (5, 30 e 60 min).

Considerando o potencial das nanocápsulas à base do óleo essencial de *T. minuta* como produto desinfetante eco-friendly, o objetivo do presente estudo foi realizar a avaliação da sua atividade desinfetante utilizando diferentes metodologias para testes desinfetantes, visando o uso externo no manejo da ordenha. Para isso buscou-se uma metodologia que possibilitasse a simulação do ambiente da ordenha, que inclui matéria orgânica e diferentes tipos de superfícies. Através dos resultados obtidos, pretende-se propor o seu uso como produto pós-dipping em manejo de ordenha de vacas leiteiras, resultando em uma alternativa diferenciada para sistemas de produção sustentáveis.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 *Tagetes minuta*

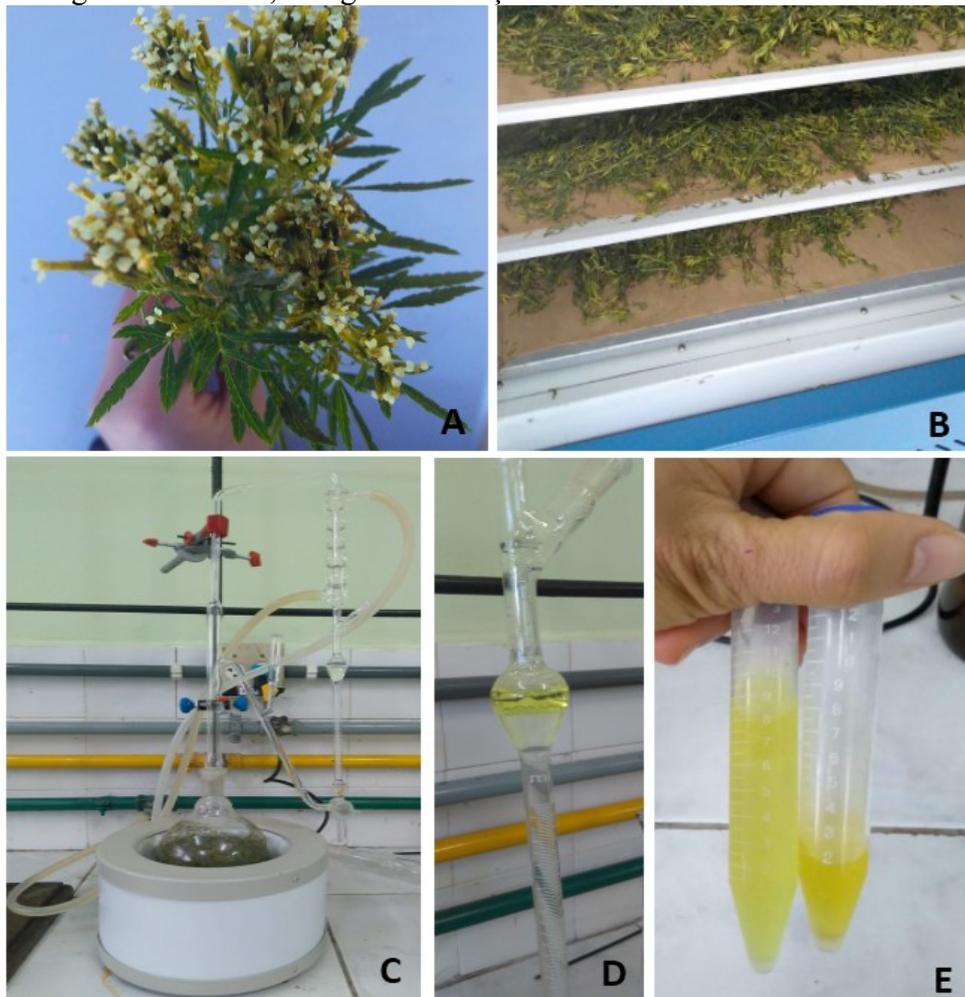
O óleo essencial de *T. minuta* foi produzido a partir de plantas colhidas em estágio inicial de floração, em áreas de crescimento espontâneo localizadas em um Assentamento no segundo Distrito do Município de Piratini (31°66'16,46"S; 53°06'40,83"W), na região sul do Rio Grande do Sul (Figura 2). A parte aérea, incluindo folhas, flores e caules mais finos foi coletada e seca em estufa de circulação forçada de ar à 35°C por 48 a 72 horas (Figura 2). As plantas secas que não foram imediatamente utilizadas foram armazenadas em embalagens plásticas, hermeticamente fechadas e armazenadas a -20°C.

Conforme a lei nº 13.123/2015, o presente estudo foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) sob o Cadastro nº AFAE10F (Anexo 1). Uma amostra da planta foi encaminhada ao Herbário PEL da Universidade Federal de Pelotas-RS, depositada e identificada sob o registro PEL 17.050.

5.1.1 Extração do óleo essencial de *Tagetes minuta*

O material vegetal seco (100 g), pulverizado em moinho de facas, foi colocado com água destilada em um balão volumétrico com capacidade de 2.000 mL. O balão foi acoplado ao aparelho de Clevenger e a extração foi realizada pelo período de 4 horas conforme metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira (2010). O óleo essencial foi retirado com auxílio de uma pipeta de Pasteur e seco em sulfato de sódio anidro (Figura 2). O óleo extraído foi acondicionado em frasco de vidro âmbar hermeticamente fechado, ao abrigo da luz e armazenado a -6°C.

Figura 2 – Coleta, secagem e extração do óleo essencial de *T. minuta*.



A- Ramo de *T. minuta*; B- Secagem em estufa; C- Extração do óleo essencial em Aparelho Clevenger; D- Bureta de graduação para verificação do rendimento do processo de extração; E- Óleo essencial de *T. minuta*.

Fonte: Arquivo pessoal, (2019).

5.1.2 Caracterização química do óleo essencial de *Tagetes minuta*

A composição do óleo essencial foi determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/MS) na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química da UFSC. A análise via CG/MS foi realizada no instrumento Agilent CG 7890A acoplado ao detector MS Agilent 5975C. Para isso, a coluna HP-5MS (Agilent), que é uma coluna capilar de sílica fundida (30 m de comprimento x 250 μm id x 0,25 μm de espessura de filme composta por 5% de fenil-95% de metilpolisiloxano) foi conectada a um detector de quadrupolo operando em modo positivo EI a 70 eV.

A varredura de massa variou de 41 a 415 m/z e o gás hélio foi usado como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 0,91 mL/min. As temperaturas do injetor e da interface foram

250 e 240°C, respectivamente. A proporção de divisão foi de 50: 1 e o atraso do solvente foi de 5,0 minutos. O volume de injeção foi de 1,0 µL com amostrador automático Agilent GC Sampler 80, equipado com uma seringa de 10 µL.

O programa de temperatura do forno consistia em aumentar de 60°C, em seguida, 3°C/min para 246°C (concluindo um tempo de execução de 62 minutos). Os compostos foram identificados considerando os resultados obtidos de seus espectros de massa e comparando-os com os do National Institute of Standards and Technology (NIST, 2011).

5.2 PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS

As nanocápsulas com o óleo essencial de *T. minuta* (NC-TM) foram preparadas utilizando a técnica de precipitação do polímero pré-formado conforme metodologia descrita por Bolzan (2018). Brevemente, a fase orgânica foi preparada a partir da mistura de duas soluções (1:1), uma contendo 0,50 g do polímero poli-ε-caprolactona (PCL-policaprolactone 60,000 M_n, Sigma-Aldrich) em acetona (25 mL) e a outra contendo 0,25 g de surfactante lipofílico lecitina (Lecitina - LIPOID S 75-3N, Alemanha) em etanol (25 mL). O óleo essencial de *T. minuta* (5 g) foi adicionado à fase orgânica sob agitação magnética. A fase aquosa foi constituída por 100 mL de água destilada com 1% de surfactante hidrofílico poloxamer 188 (Kolliphor P188 micro, BASF, EUA). Sob agitação magnética vigorosa, na velocidade 5 a 6 (Fisatom[®] 752A), a fase orgânica foi adicionada sobre a aquosa, lentamente, por meio de gotejamento (110 mL/h – 1 gota/1,5 segundos). O solvente orgânico foi removido mantendo-se a suspensão sob agitação por 3 a 4 horas (Figura 3). O volume final da suspensão foi ajustado para 100 mL, após filtração a vácuo em papel filtro.

Figura 3 – Preparação das nanocápsulas com o óleo essencial de *T. minuta*.



Fase aquosa; B- Fase orgânica; C- Gotejamento da fase orgânica sobre a fase aquosa; D-Evaporação do solvente sob agitação magnética.

Fonte: Arquivo pessoal, (2019).

As NC-TM foram armazenadas ao abrigo da luz e sob refrigeração (4°C) para posterior uso por um período máximo de 7 dias. A determinação do teor de óleo nas nanocápsulas foi realizada através da leitura em espectrofotômetro a 280 nm (Bel UVM51). O acompanhamento do teor de óleo encapsulado nas NC-TM foi realizado semanalmente, durante 15 dias. As análises foram realizadas conforme metodologia padronizada por Bolzan, (2018). Brevemente, adicionou-se acetonitrila as NC-TM (10:1, v/v) para haver a liberação do conteúdo de óleo encapsulado, seguido de leitura em espectrofotômetro a 280 nm. O teor de óleo essencial nas NC-TM foi determinado utilizando-se uma curva de calibração do óleo essencial (3 a 18 µg/mL).

5.3 ATIVIDADE DESINFETANTE DAS NANOCÁPSULAS

5.3.1 Teste desinfetante padrão

A atividade desinfetante foi testada *in vitro* conforme protocolo do Comitê Europeu de Padronização (CEN) BSEN 1040:2005 (BSEN, 2005) para teste desinfetante, utilizando as cepas padrão de *P. aeruginosa* ATCC 15442 e *S. aureus* ATCC 6538. Os inóculos de ambos microrganismos foram preparados utilizando uma densidade populacional 10^8 UFC/mL. A turbidez foi comparada na escala Mcfarland 0,5 e foi aferida em espectrofotômetro (Bel UVM51) com valor de absorvância entre 0,08 e 0,1 a 620 nm.

Os testes foram realizados utilizando tubos de vidro de 10 mL, previamente esterilizados. Foram testadas três diferentes concentrações das NC-TM, i.e., 100% (v/v) (NC-TM com 3,35% de óleo essencial), 50% (v/v) (NC-TM com 1,7% de óleo essencial) e 0,2% (v/v) (NC-TM com 0,0068 % de óleo essencial). Um controle positivo com hipoclorito NaHCO₃ - água sanitária comercial (Clorofina®) a 2% (pura), 1% e 0,00025% foi incluído no teste. Além disso, testes de controle de toxicidade do ensaio, do neutralizante e do neutralizante com o produto foram realizados simultaneamente, conforme preconizado pela norma utilizada (BSEN, 2005).

O teste foi realizado à 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) e os tempos de contato do inóculo com o produto foram 5 min (tempo mínimo exigido pela norma), 15 min e 30 min. Os tempos maiores de contato foram escolhidos para validar a ação do produto por um período maior, como o que ocorre quando este é utilizado como pós-dipping.

O teste foi realizado em triplicata e teve como finalidade colocar os microrganismos do inóculo em contato com o produto testado (NC-TM e controle positivo) resultando em uma solução contendo produto e bactérias. Após os tempos de contato pré-definidos, uma alíquota foi retirada dessa suspensão e colocada com um neutralizante comercial (D/E Neutralizing Broth 7562A - acumedia®) para cessar a ação do produto. Desta maneira, a ação do produto naquele intervalo de tempo de contato foi verificada sobre a redução do número de microrganismos. A redução foi expressa em UFC/mL. Após a neutralização, 100 μL da solução teste neutralizada foi colocada em placas contendo ágar TSA (Tryptic Soy Agar), em duplicata, e incubadas à 37°C $\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após esse tempo, a contagem das UFC foi realizada para verificar a redução em comparação com as placas do inóculo inicial. A eficácia como

desinfetante foi considerada quando houve a redução de ao menos 5 logs na densidade populacional do inóculo (BS EN 1040:2005).

5.3.2 Teste desinfetante com matéria orgânica

O teste desinfetante com matéria orgânica foi realizado conforme o teste desinfetante padrão, em triplicata, utilizando os mesmos microrganismos e mesma densidade populacional (10^8 UFC/mL). No entanto, o teste foi modificado pela adição de 10% de leite no volume total da suspensão, simulando assim a presença de matéria orgânica. Neste ensaio, foram testados dois tempos de contato (15 e 30 minutos). Foram incluídos o controle positivo com hipoclorito a 2% e um controle negativo com água. Após o tempo de contato entre produtos e o inóculo, a neutralização da ação do produto foi realizada e 100 μ L do conteúdo dos tubos foram plaqueados, incubados e contados conforme o teste padrão.

5.3.3 Teste desinfetante em superfícies

O teste desinfetante em superfícies foi realizado em triplicata, com os mesmos microrganismos dos ensaios anteriores. As superfícies testadas foram quadrados de 2x2 cm de inox, cerâmica e borracha (Figura 4), seguindo a metodologia descrita por Matos (2014), com modificações. Inicialmente, o inóculo foi preparado em uma densidade populacional de 10^8 UFC/mL, também utilizando a escala Mcfarland a 0,5 e ajustando-se a suspensão com a leitura da absorbância entre 0,08 a 0,1 em espectrofotômetro (620 nm). Em seguida foram preparadas diluições seriadas até obtenção da densidade populacional de 10^4 UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

Figura 4 – Inox, cerâmica e borracha utilizadas no teste desinfetante em superfícies.



Fonte: Arquivo pessoal, (2020).

O teste foi realizado pela adição de 10 μL do inóculo com densidade 10^4 UFC/mL sobre as superfícies estéreis a serem testadas, resultando em uma contaminação da superfície com densidade de 10^2 UFC/mL (100 UFC/mL). Após 10 min para secagem do inóculo, 200 μL das NC-TM (100%) e dos controles positivo e negativo (hipoclorito e água, respectivamente) foram adicionados e mantidos em contato por 15 e 30 min. Após esse período, o excedente do conteúdo das superfícies foi retirado e as mesmas foram colocadas sobre placas contendo TSA, fazendo um “print” ou carimbo por 30 segundos. As placas foram incubadas a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas e verificada a ação dos produtos através da categorização dos níveis de redução dos microrganismos expressos em UFC/mL, e o percentual de redução em relação ao inóculo, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Categorização dos níveis de redução dos microrganismos pelos números de colônias presentes e o percentual de redução comparado ao inóculo.

Categorias	Nº de colônias por categoria	% de redução
1	0	100
2	1 – 5	99 – 95
3	6 – 10	94 – 90
4	11 – 20	89 – 80
5	> 20	<79

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir dos resultados foi realizada análise estatística descritiva para os dados. Para os testes de desinfetantes padrão e presença de matéria orgânica, os dados foram transformados em um índice de Inibição para cada tratamento e tempo, resultado da fórmula:

$$II=1-(IT/IB) \quad (1)$$

onde IT é a média das repetições da contagem de UFCs de cada tratamento teste em um dado tempo e uma dada bactéria, dividido pela contagem de UFCs bacterianas do inóculo. Todos valores de UFC sofreram transformação logarítmica para normalização dos resultados, após serem adicionados de uma unidade já que não é possível transformação logarítmica para dados iguais a zero.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 ÓLEO ESSENCIAL DE *Tagetes minuta*

A composição química do óleo essencial de *T. minuta* está mostrada na Tabela 2. Dos 10 compostos encontrados, 5 destacaram-se como majoritários, representando 95,01% da área total do cromatograma.

Tabela 2 – Composição química do óleo essencial de *T. minuta* coletada na região sul do Rio Grande do Sul (Brasil) nos meses de junho e julho de 2019.

Composto	Nome	%
1	di-hidrotagetona	54.46
2	trans-tagetona	18.51
3	Limoneno	9.93
4	trans- β -Ocimeno	6.74
5	cis-tagetona	5.37
6	Biciclogermacreno	1.74
7	não identificado	0.96
8	Cariofileno	0.88
9	Sabineno	0.84
10	não identificado	0.58
Total		100

A composição química do óleo essencial em estudo é bastante similar a encontrada por Gomes (2017), em plantas oriundas de regiões bem próximas. Da mesma forma, Olanda (2018) encontrou no óleo essencial dessa espécie trans-tagetona, di-hidrotagetona, cis-tagetona e limoneno. Sperandio et al. (2019), também encontrou os compostos cis-tagetona e di-hidrotagetona como majoritários em amostras do óleo essencial de *T. minuta* produzido em Santa Catarina.

Apesar da semelhança na composição química do óleo essencial mencionada acima, é importante destacar que de maneira geral fatores como local de colheita, período e processamentos podem resultar em composição química diferente, mesmo de plantas oriundas de uma mesma região ou de regiões próximas (GAKKUB et al., 2016; SALEHI et al., 2018; SCHIAVON et al., 2015). Alterações na composição química, bem como no rendimento do óleo, estão também ligadas ao estágio fenológico da planta. Quanto mais precoce for a colheita, maior será o volume de folhas em relação a flores. Neste caso, um menor rendimento de óleo e

maior conteúdo de di-hidrotagetona tem sido relatado para o óleo essencial de *T. minuta*. Já em período de floração plena, um maior rendimento do óleo tem sido observado e d-limoneno, di-hidrotagetona e trans-tagetona têm sido relatados como compostos majoritários. Com o avanço no desenvolvimento da planta, os compostos cis- β -ocimeno e cis-tagetona têm sido descritos como majoritários no óleo essencial desta espécie (FONSECA, 2018; KUMAR, PANDEY & VARSHNEY, 2019).

Cabe destacar que no presente estudo as plantas foram colhidas em estágio inicial de floração, apresentando maior volume de folhas em relação às flores. Apesar da predominância do composto di-hidrotagetona no óleo essencial em estudo, é importante considerar que em se tratando de matrizes complexas, os compostos não majoritários podem também contribuir para as suas propriedades biológicas. A ação sinérgica entre os diferentes compostos bem como suas particularidades de modo e sítio de ação frente aos microrganismos têm sido descritas (GAKKUBI et al., 2016; PAVONI et al., 2020).

7.2 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS

As NC-TM foram preparadas com êxito através da técnica empregada. As suspensões apresentaram características macroscópicas similares às descritas por Bolzan (2018), i.e., aspecto homogêneo, leitoso, com coloração amarelo-esverdeada e odor característico do óleo essencial de *T. minuta* (Figura 5). Apesar das diversas críticas a técnica utilizada, i.e., precipitação do polímero pré-formado, tais como como interferência no tamanho das gotículas pelo tipo de ativo, óleo ou surfactante e baixo teor de ativo encapsulado (SAKEENA et al., 2011; SINGH et al., 2017), a mesma se mostrou eficiente no presente estudo.

Diferentemente do estudo de desenvolvimento proposto por Bolzan (2018), que preparou volumes pequenos (10 mL), no presente estudo a técnica mostrou-se eficiente na preparação de um volume bem maior de nanocápsulas (100 mL), sugerindo o potencial de escalonamento. Ainda em relação a técnica, foi verificado que a temperatura ambiente deve ser utilizada durante a preparação, uma vez que temperaturas abaixo ou acima de 25°C mostraram influenciar negativamente na obtenção das NC-TM. Portanto, dentre as vantagens do método, que se mostrou claramente reprodutível, está seu baixo custo econômico, energético e tecnológico, sem demandar demasiada energia ou equipamentos específicos (FESSI et al., 1989).

Figura 5 – Aspecto macroscópico das nanocápsulas com o óleo essencial de *T. minuta*.



Fonte: Arquivo pessoal, (2020).

As formulações foram armazenadas por no máximo 15 dias a 4°C, e durante este período, não foram observadas segregação de fases ou qualquer outra alteração macroscópica, sugerindo estabilidade da formulação. O teor de óleo na suspensão foi ainda avaliado semanalmente, por um período de 0 a 15 dias, devido à alta volatilidade dos compostos. Logo após o preparo, o teor de óleo foi em média $3,35 \pm 0,51\%$, representando uma eficiência de encapsulação de 67% (m/v).

Cabe destacar que os valores obtidos de eficiência de encapsulação do óleo divergem de outros autores que descrevem o baixo teor de princípio ativo encapsulado pela técnica de preparo utilizada, i.e., precipitação do polímero pré-formado (SAKEENA et al., 2011; SINGH et al., 2017). Além disso, os teores de óleo encapsulado no presente estudo são maiores do que o relatado por Bolzan (2018), autora que desenvolveu o método de obtenção da suspensão aqui reproduzido. Tal resultado deveu-se provavelmente à velocidade menor do gotejamento da fase orgânica sobre a fase aquosa (110mL/hora – 1 gota/1,5 segundos) no presente estudo, bem como a utilização de uma velocidade de agitação maior (velocidade 5 a 6 - Fisatom[®] 752A). Ao aumentar a agitação durante o desenvolvimento possivelmente melhorou-se a capacidade de encapsulação do óleo em um dado tempo. Portanto, ao reduzir o tempo de exposição do óleo não encapsulado ao ambiente, provavelmente diminuiu-se a volatilização do mesmo.

O teor de óleo essencial nas suspensões após 7 e 15 dias de armazenamento diminuiu 0,6 e 1,55% (m/v), i.e., cerca de 18% e 46%, nas suspensões, respectivamente (Tabela 3). Diante desse resultado, as suspensões foram utilizadas nos ensaios biológicos em até 7 dias após o seu preparo, as quais continham em torno de $3,35 \pm 0,51\%$ de óleo essencial de *T. minuta*.

Tabela 3 – Teor de óleo essencial* de *T. minuta* encapsulado nas suspensões a 5% (m/v) após 15 dias de preparação.

Dias	Teor de óleo essencial (%)
0	3,35 ± 0,71
7	2,76 ± 0,66
15	1,8 ± 0,53

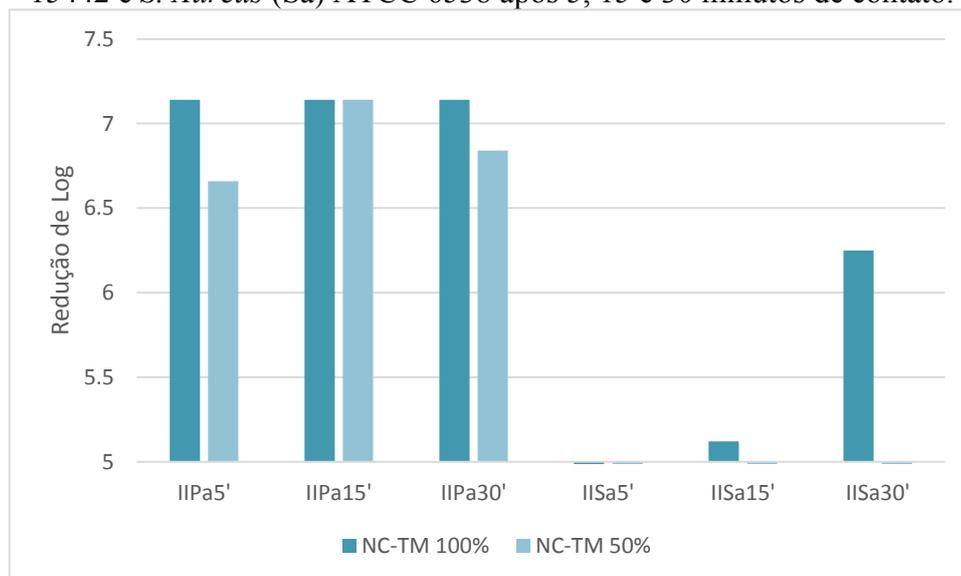
*n= três repetições independentes para cada um dos períodos avaliados.

7.3 ATIVIDADE DESINFETANTE DAS NANOCÁPSULAS

7.3.1 Teste desinfetante padrão

A atividade desinfetante das NC-TM frente à *P. aeruginosa* foi demonstrada (Figura 6). Para esse microrganismo houve redução de pelo menos 5 logs nas duas concentrações testadas (100 e 50%, v/v) e nos três tempos de contato testados. Por outro lado, as NC-TM não reduziram em 5 logs o crescimento de *S. aureus* utilizando-se um tempo de contato de 5 minutos, bem como na concentração de 50% (v/v). Para esse microrganismo, a ação desinfetante foi efetiva quando a suspensão não foi diluída (100%, v/v) e somente após 15 e 30 minutos de contato (Figura 6).

Figura 6 – Ação desinfetante das nanocápsulas com óleo essencial de *T. minuta*, nas concentrações de 100% e 50% (v/v), frente às cepas padrão de *P. aeruginosa* (Pa) ATCC 15442 e *S. Aureus* (Sa) ATCC 6538 após 5, 15 e 30 minutos de contato.



IIPa/IISa-Índice de Inibição de *Pseudomonas aeruginosa*/*Staphylococcus aureus*: $I_{Red} = 1 - (\log(1+CBF)/\log(1+CBI))$

Os resultados aqui encontrados frente a *S. aureus* são similares aos de Bolzan (2018), que utilizou a mesma metodologia. No entanto, frente a *P. aeruginosa*, os resultados do presente estudo foram diferentes, já que as NC-TM mostraram ação desinfetante também quando utilizadas diluídas (50%, v/v), o que deveu-se provavelmente ao maior teor de óleo encapsulado na suspensão, uma vez que estas continham 1,68% (m/v) de óleo essencial.

No presente estudo, um tempo de contato menor, i.e., 15 minutos, foi também incluído. Um tempo menor do que 30 min foi interessante pelo fato de confrontar a agilidade em eliminar os microrganismos e ao mesmo tempo se manter com esta ação por um determinado período. Para o uso como pós-dipping, por exemplo, a rapidez é importante para reduzir a carga microbiana assim que retiradas as teteiras, evitando contaminação cruzada entre vacas e possível ocorrência de mastite contagiosa. Esse momento é crucial, pois o esfíncter do teto permanece aberto por cerca de 30 minutos, necessitando de ação imediata e ao mesmo tempo duradoura do desinfetante (BLOWEY & EDMONDSON, 2010). Ao permanecer aberto o esfíncter do teto, o animal também fica exposto à entrada de microrganismos via ascendente para os tecidos mamários internos. Assim a ação prolongada do produto se faz extremamente relevante, pois ao final da ordenha os animais, ao se deslocarem ou se deitarem nos ambientes de manejo, estão estabelecendo contato direto com os microrganismos. Essa durabilidade da ação se deve principalmente ao potencial de proteção do ativo que a nanotecnologia pode proporcionar ao produto (BILIA et al., 2014; MOHANRAJ & CHEN, 2006; PAVONI et al., 2020; YOUSSEF et al., 2019).

A despeito de outros estudos com extratos ou o óleo essencial de *T. minuta* (ABAAS, et al., 2018; BOLZAN, 2018; OLANDA et al., 2019; SPERANDIO et al., 2019) para o melhor do nosso conhecimento, não há outros registros além do de Bolzan (2018) que associem a nanotecnologia para a formulação de um produto antimicrobiano e desinfetante utilizando essa espécie.

Ressalta-se ainda, que as concentrações do óleo essencial utilizadas neste ensaio (0,61 mg/mL; 0,30 mg/mL e 0,09 mg/mL) quando comparadas às do controle positivo com hipoclorito (36 mg/mL, 16 mg/mL e 2,5 ppm), são bem inferiores (cerca de 100 x), o que nos remete a possibilidade de futuros testes com uma concentração maior de óleo adicionado ao preparo das NC-TM, já que as mesmas seriam com finalidade para uso externo.

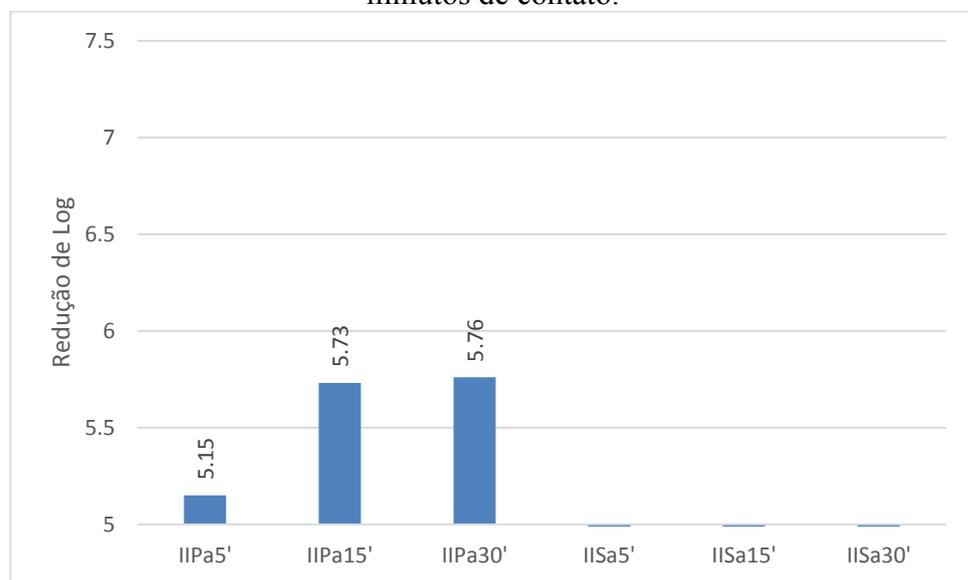
Além disso, em alguns estudos anteriores a densidade de inóculo utilizada foi menor do que a do presente estudo. Both et al. (2016), utilizaram uma densidade menor de inóculo da cepa padrão de *S. aureus* ATCC 6538 e *S. aureus* metilicina resistente ao avaliarem a eficácia

desinfetante de extratos hidroetanólicos de *Achyrocline saturoioides* Lam. (macela). Assim, sugere-se a realização de ensaios futuros com densidades de inóculo menores para avaliar a eficácia das NC-TM.

7.3.2 Teste desinfetante com matéria orgânica

Considerando os resultados obtidos no teste desinfetante padrão, este e os demais ensaios foram realizados com as NC-TM sem diluição. No teste desinfetante realizado com a presença de matéria orgânica, as NC-TM mostraram-se eficazes na redução do crescimento de *P. aeruginosa*, em pelo menos 5 log, após os 3 tempos de contato testados. Já frente a *S. aureus* na presença de matéria orgânica, as NC-TM não demonstraram atividade desinfetante, uma vez que não houve a redução de 5 log do crescimento microbiano necessária para admiti-lo como desinfetante (BS EN 1040, 2005) (Figura 7).

Figura 7 – Ação desinfetante das nanocápsulas com o óleo essencial de *T. minuta* frente à cepa padrão de *P. aeruginosa* (Pa) ATCC 15442 e *S. aureus* (Sa) ATCC 6538 após 5, 15 e 30 minutos de contato.



IIPa/IISa-Índice de Inibição de *Pseudomonas aeruginosa*/*Staphylococcus aureus*: $I_{Red} = 1 - \frac{\log(1+CBF)}{\log(1+CBI)}$

Em estudo utilizando metodologia similar, a ação desinfetante de *T. minuta*, com e sem a presença de matéria orgânica foi encontrada (SCHUCH et al., 2008). No entanto, os autores testaram outras formas de apresentação do produto teste (extratos e decocto) e tempos de contato também distintos. Os extratos hidroalcoólicos da planta não mostraram eficácia frente ao crescimento de *P. aeruginosa*, microrganismo fortemente eliminado nos testes do

presente trabalho. Os mesmos autores encontraram resultados satisfatórios do extrato hidroalcoólico frente a *S. agalataiae* sem e com presença de matéria orgânica, após 30 segundos e 10 minutos de contato, respectivamente. Ainda, corroborando com os resultados do presente estudo, frente a *S. aureus*, apenas o tempo de contato de 30 minutos foi eficaz, e na presença de matéria orgânica, a ação da planta foi limitada (SCHUCH et al., 2008). Sugere-se portanto que em estudos futuros tempos de contato ainda maiores sejam testados, uma vez que pode haver a liberação gradual e ação do ativo encapsulado, possibilitando a melhora de sua eficácia.

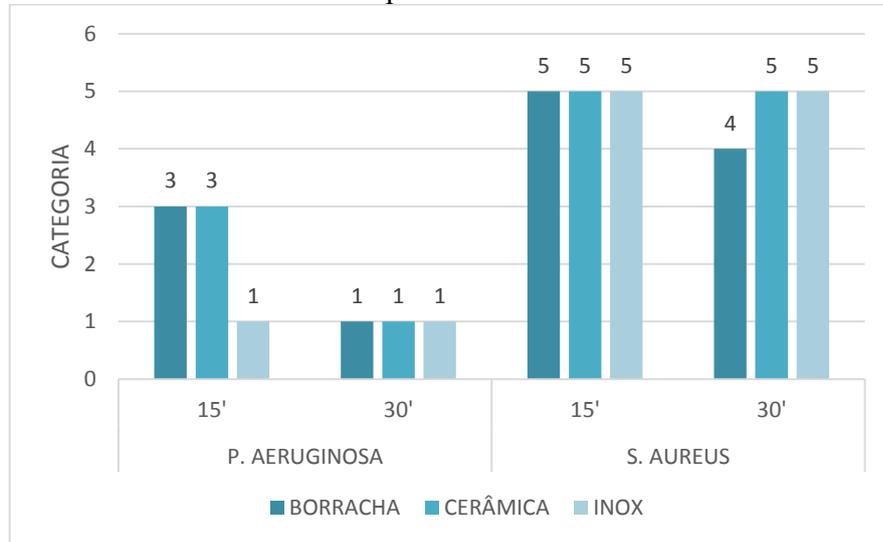
Outros autores também fizeram testes na presença de matéria orgânica e encontraram resultados semelhantes, onde sua adição se mostrou como um desafio para o produto, reduzindo muitas vezes sua eficácia germicida inclusive em testes com desinfetantes comerciais já consolidados como tal (MORENO, NOVOA & LOVELÍ, 2018; SATO et al., 2019).

No presente estudo, o leite pode ter interferido não somente por proporcionar condições ótimas de multiplicação aos microrganismos, servindo de substrato aos mesmos (KUDA et al., 2015), mas também pelo fato de interagir com o desinfetante afetando sua disponibilidade e consequente ação sobre o microrganismo (BEAN, 1967). Tais resultados indicam que a inclusão desse fator em testes desinfetantes mostra-se necessária, com o intuito de verificar sua ação simulando uma situação prática, como o contato com o leite ou com outras fontes de matéria orgânica como poeira, resíduos de fezes e do ambiente de instalações ou alojamentos dos animais. No entanto, sugere-se em estudos futuros testar inóculos com diferentes densidades, para verificação da ação do produto frente a *S. aureus*, já que em circunstâncias reais de campo a carga microbiana provavelmente seria menor do que a testada.

7.3.3 Teste desinfetante em superfícies

No teste desinfetante em superfícies, a melhor ação das NC-TM foi frente a *P. aeruginosa* nos 2 tempos de contato (15 e 30 minutos) e sobre as 3 superfícies, enquanto que frente a *S. aureus* não foi verificada atividade desinfetante (Figura 8). A avaliação deste último teste foi baseada em categorias de ação conforme o crescimento das UFCs nas placas e percentual de redução em relação ao inóculo, sendo a categoria 1 como mais eficiente e 5 menos eficiente, apresentando 95% de eficácia no tempo de contato de 30 minutos e ao menos 90% de eficácia em 15 minutos, frente a *P. aeruginosa*, nas 3 superfícies. Para *S. aureus*, apenas a superfície de borracha e o tempo de 30 minutos apresentaram redução de pelo menos 80% nas UFCs. Nos demais tempos e materiais os resultados não foram satisfatórios.

Figura 8 – Teste desinfetante com nanocápsulas do óleo essencial de *T. minuta* em superfícies de borracha, cerâmica e inox frente às cepas padrão de *P. aeruginosa* ATCC 15442 e *S. aureus* ATCC 6538 após 15 e 30 minutos de contato.



Resultados de testes de avaliação da atividade desinfetante de *T. minuta*, incluindo sobre superfícies são escassos na literatura. Para o melhor do nosso conhecimento, os resultados aqui apresentados são inéditos. Por outro lado, estudos buscando avaliar a reação dos microrganismos frente ao uso rotineiro de produtos existentes (MEDEIROS et al., 2009; SATO et al., 2019) e a busca por novos produtos desinfetantes com base em produtos naturais, que incluam testes em superfícies, foram realizados previamente (HELTAHIR & RAGER, 2020; KUDA et al., 2015.; MUREZA et al., 2021). Em um estudo para avaliar a ação antifúngica de tintura e extratos vegetais de orégano (*Origanum vulgare*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*), por exemplo, frente a fungos do complexo *Sporothrix* a autora utilizou metodologia semelhante, acrescentando também matéria orgânica ao teste. Apenas o orégano mostrou atividade antifúngica com e sem a presença da matéria orgânica (MATOS, 2014).

O potencial desinfetante de outras espécies como um produto base de extrato de *Acacia nilótica* foi demonstrado. O extrato mostrou eficácia frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em superfícies de silicone, as quais são utilizadas em procedimentos odontológicos (HELTAHIR & RAGER, 2020). Desinfetantes a base de extratos de *Opuntia ficus-indica* e *Allium sativum* também mostraram-se eficazes na higienização de tetos de vacas e frente a bactérias patogênicas do leite cru (MUREZA et al., 2021).

O teste em superfícies tem importante relevância pois em ambientes de manejo de ordenha é muito comum a presença e o contato do produto leite com as superfícies testadas. A borracha está presente nos conjuntos de teteiras, bem como o inox, incluindo os tanques de

resfriamento e tubulações. A cerâmica reveste as estruturas internas da sala de ordenha e também é uma superfície que está em contato com o animal. Estes e outros tipos de superfícies, como a própria pele do teto, são constantemente contaminados por substâncias orgânicas, sejam elas leite, poeira ou fezes e seus componentes biológicos como gorduras, proteínas e inclusive microrganismos (SILVA et al., 2018). Estes por sua vez, ao entrar em contato com uma superfície, iniciam seu processo de multiplicação e sobrevivência sobre ela, incluindo nisso a formação de biofilme. Esta é uma maneira que os microrganismos têm de proporcionar condições mais favoráveis à sua multiplicação e à sua proteção frente a ação de fatores externos e à produtos com atividade biocida (MACHADO, 2005).

Características das superfícies como topografia ou rugosidade, são fatores que influenciam na adesão das bactérias e conseqüentemente na sua eliminação pelos produtos sanitizantes. Superfícies mais rugosas, com irregularidades, arranhaduras ou rachaduras proporcionam uma maior área de contato com os microrganismos e maior adesão, além dessas características servirem de espaços para deposição e multiplicação dos mesmos dificultando a ação dos desinfetantes (BOHINC et al., 2017; BOHINC et al., 2016; CHATURONGKASUMRIT et al., 2011; MEDIASWANTI, 2016).

No estudo em questão, os quadrados de borracha e cerâmica apresentavam essas irregularidades em suas superfícies de forma expressiva, quando em comparação ao inox, e essa característica foi um fator que provavelmente contribuiu para os resultados, i.e., o teste na superfície de inox apresentou os melhores resultados.

Outra superfície importante, porém, não testada neste trabalho é a superfície da pele do teto, que também é constantemente desafiada pelas adversidades ambientais como temperatura, contaminação e exposição aos produtos sanitizantes. Apesar dos testes não a terem incluído, ela segue sendo o foco de trabalhos, inclusive deste, na busca por produtos e métodos desinfetantes (BAUMBERGER, GUARIN & RUEGG, 2016; BOTH et al., 2014; RAMALHO et al., 2012).

No presente estudo, os resultados encontrados mostraram que as NC-TM tiveram bom potencial desinfetante frente a *P. aeruginosa* no teste desinfetante, mesmo na presença de matéria orgânica e no teste desinfetante em superfícies. Isso pode resultar em um produto promissor no combate à bactérias gram-negativas e microrganismos presentes nas superfícies, potencialmente causadores da mastite de origem ambiental.

8 CONCLUSÃO

A atividade desinfetante do produto em teste, as NC-TM, foi demonstrada frente ao microrganismo *P. aeruginosa* nas três categorias de testes, desinfetante padrão, desinfetante com adição de matéria orgânica e desinfetante em superfícies, i.e, inox, cerâmica e borracha, nos 3 tempos de contato testados (5, 15 e 30 min). Para *S. aureus* a ação desinfetante foi limitada em todos os testes realizados. Portanto, as nanocápsulas com o óleo essencial de *T. minuta* mostraram-se promissoras para uso como desinfetante, com potencial para prevenção de mastite de origem ambiental, principalmente como opção em sistemas de produção sustentáveis. Sugere-se a realização de testes *in vivo*, como testes para verificação de redução de contagens bacterianas da superfície do teto ou mesmo do leite, bem como testes que avaliam redução de novas infecções intramamárias.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; ABBAS, R. Z.; MASOOD, S.; IQBAL, Z.; KHAN, M. K.; SALEEMI, M. K.; RAZA, M. A.; MAHMOOD, M. S.; KHAN, J. A.; SINDHU, Z. D. Acaricidal and insecticidal effects of essential oil against ectoparasites of veterinary importance. **Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. v.17, n.5, p.441-452, 2018.
- AGUAYO, P. R.; LARENAS, T. B.; GODOY, C. A.; RIVAS, B. C.; GONZALEZ-CASANOVA, J.; ROJAS-GÓMEZ, D.; FUENTES, N. C. Antimicrobial and Antibiofilm Capacity of Chitosan Nanoparticles against Wild Type Strain of *Pseudomonas* sp. Isolated from Milk of Cows Diagnosed with Bovine Mastitis. **Antibiotics**. v.28, n.9, p.551, 2020.
- ALBERTI, T.; COELHO, D. S.; VOYTENA, A. P.; MAZZARINO, L. Effect of Propolis Nanoparticles on Early-Stage Wound Healing in a Diabetic Noncontractile Wound Model. **Nanotechnology and Advanced Material Science**. v.2, n.1, p.1-10, 2019.
- ALBERTI, T.; COELHO, D. S.; VOYTENA, A. P.; PITZ, H.; PRÁ, M.; MAZZARINO, L.; KUHNEN, S.; RIBEIRO-DO-VALE, R. M.; MARASCHIN, M.; VELEIRINHO, B. Nanotechnology: A Promising Tool Towards Wound Healing. **Current Pharmaceutical Design**. v.23, n.00, p.3515-3528, 2017.
- ALI, N. A. A.; SHAROPOV, F. S.; AL-KAF, A. G.; HILL, G. M.; ARNOLDD, N. Composition of Essential Oil from *Tagetes minuta* and its Cytotoxic, Antioxidant and Antimicrobial Activities. **Natural Product Communications**. v.9, n.2, p.265-268, 2014.
- ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; MATIAS, J.; BARROS, J. C.; CUNHA, R. *Tagetes minuta* – uma nova alternativa no controle fitoterápico de carrapatos. Campo Grande, MS: **Documentos Embrapa Gado de Corte** 207, p.30, 2013.
- ANGELOPOULOU, A.; HOLOHAN, R.; REA, M. C.; WARDA, A. K.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bovine mastitis is a polymicrobial disease requiring a polydiagnostic approach. **International Dairy Journal**. v.99, 2019.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CORONEO, V.; DESSI, S.; CABRAS, P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas* essential oils from stem/leaves and Flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.54, n.12, p.4364–4370, 2006.
- ANWER, M. K.; JAMIL, S.; IBNOUF, E. O.; & SHAKEEL, F. Enhanced antibacterial effects of clove essential oil by nanoemulsion. **Journal of Oleo Science**. v.63, p.347–354, 2014.
- ARAÚJO, L. F.; MELO, T. N. L.; FORTUNA, J. L. Avaliação da eficácia do álcool comercial para desinfecção de superfícies. **Revista Científica do ITPAC, Araguaína**. v.12, n.2, p.67, 2019.

ARAÚJO, L. S.; ARAÚJO, R. S.; SERRA, J. L.; NASCIMENTO, A. R. Composição química e susceptibilidade do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L., família Lamiaceae) frente à cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonellacholeraesuis*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.33, n.1, p.73-78, 2015.

AVANCINI, C. A. M. & WIEST, J. M. Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. e Shlecht. –Guttiferae (“escadinha/sinapismo”), frente diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.10, n.1, p.64-69, 2008.

BAHAMONDE-NORAMBUENA, D.; MOLINA-PEREIRA, A.; CANTIN, M.; MUÑOZ, M.; ZEPEDA, K. & VILOS, C. Polymericnanoparticles in dermocosmetic. **International Journal of Morphology**. v.33, n.4, p.1563-1568, 2015.

BAJERSKI, L.; MICHELS, L. R.; COLOMÉ, L. M.; BENDER, E. A.; FREDDO, R. J.; BRUXEL, F.; HAAS, S. E. O uso de óleos vegetais brasileiros em nanoemulsões: atualização sobre preparação e aplicações biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.52, p.347-363, 2016.

BANERJEE, S.; BATABYAL, K.; JOARDAR, S. N.; ISORE, D. P.; DEY, S.; SAMANTA, I.; SAMANTA, T. K.; MURMU, S. Detection and characterization of pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* from bovine subclinical mastitis in West Bengal, India. **Veterinary World**. v.10, n.7, p.738-742, 2017.

BARBANO, D. M.; MA, Y.; SANTOS, M. V. Influence of raw milk quality on fluid milks shelf life. **Journal of Dairy Science**. v.89, p.15–19, 2006.

BARLOW, J. W.; ZADOKS, R. N.; SCHUKKEN, Y. H. Effect of lactation therapy on *Staphylococcus aureus* transmission dynamics in two commercial dairy herds. **Bio Med Central Veterinary Research**. v.9, n.28, 2013.

BAUMBERGER, C.; GUARIN, J. F.; RUEGG, P. L. Effect of 2 different premilking teat sanitation routines on reduction of bacterial counts on teat skin of cows on commercial dairy farms. **Journal of Dairy Science**. v.99, n.4, p.2915-2929, 2016.

BEAN, H. S. Types and characteristics of disinfectants. **Journal of Applied Bacteriology**. v.30, p.6–16, 1967.

BILIA, A. R.; GUCCIONE, C.; ISACCHI, B.; RIGHESCHI, C.; FIRENZUOLI, F.; BERGONZI, M. C. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2014, 2014.

BLOWEY, R. W. & EDMONDSON, P. **Mastitis in Dairy Herds**. 2ed. CABI International, Wallingford, UK. 2010.

BOLZAN, K. P. Desenvolvimento de suspensões nanoparticuladas com óleo essencial de *Tagetes Minuta l.* E sua aplicação no controle da mastite bovina. **Dissertação de Mestrado.** Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. Florianópolis, f.83, 2018.

BOHNIC, K.; ODER, M.; FINK, R.; TORRAR, K. G.; DRAZIC, G.; RASPOR, P. Factors Affecting Microbial Adhesion. **Adhesion in Pharmaceutical, Biomedical and Dental Fields.** Part 3. Chapter 8. P.167-184, 2017.

BOHNIC, K.; ODER, M.; ABRAM, A.; JEVSNIK, M.; JERSEK, B.; NIPIC, D.; KURINCIC, M.; RASPOR, P. Metal surface characteristics dictate bacterial adhesion capacity. **International Journal of Adhesion & Adhesives.** n.68, p.39–46, 2016.

BORNEMAN, L. D. & INGHAM, S. Evaluating Wisconsin dairy producer compliance and potential eligibility for international markets under existing European Union and United States Grade “A” bulk tank somatic cell count compliance criteria. **Food Policy.** v.46, p.150–156, 2014.

BOTH, J. M. C.; AVANCINI, C. A. M.; SPANIOL, B.; PETROVICK, P. R. Atividade desinfetante anti-*Staphylococcus aureus* meticilina resistentes e compostos flavonoides em *Achyrocline satureioides* Lam. (macela). **Revista Cubana de Plantas Mediciniais.** v.21, n.4, 2016.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics.** v.280, p.241-251, 2004.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA. **Portaria nº 109. Diário Oficial da União-Seção 1.** n.80, p.17, 2018.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA. Instrução Normativa Nº 46, de 6 de outubro de 2011. **Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção, bem como as listas de substâncias e práticas permitidas para uso nos Sistemas Orgânicos de Produção.** f.46, Brasil, 2011.

BSEN1040 – BRITISH STANDARD. EUROPEAN STANDAR 1040. **Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics – Test method and requeriments (phase 1).** ISBN 0580469603, 2005.

CACCIATORE, F. A.; MICHELLE DALMÁS, M.; MADERS, C.; ISAÍA, H. A.; RANDELLI, A.; MALHEIROS, P. S. Carvacrol encapsulation into nanostructures: Characterization and antimicrobial activity against foodborne pathogens adhered to stainless steel. **Food Research International.** v.133, 2020.

CHANDRA, H.; BISHNOI, P.; YADAV, A.; PATNI, B.; MISHRA, A. P.; NAUTIYAL, A. R. Antimicrobial Resistance and the Alternative Resources with Special Emphasis on Plant-Based Antimicrobials-A Review. **Plants (Basel Switzerland).** v.6, n.2, p.16, 2017.

CHATURONGKASUMRIT, Y.; TAKAHASHI, H.; KEERATIPIBUL, S.; KUDA, T.; KIMURA, B. The effect of polyesterurethane belt surface roughness on *Listeria monocytogenes* biofilm formation and its cleaning efficiency. **Food Control**. v.22, n.12, p.1893-1899, 2011.

CHRISTOFORIDIS, J. B.; CHANG, S.; JIANG, A. WANG, J.; CEBULLA, C. M. Intravitreal Devices for the Treatment of Vitreous Inflammation. **Mediators of Inflammation**. v.2012, p.8, 2012.

CHUESIANG, P.; SIRIPATRAWAN, U.; SANGUANDEEKUL, R.; YAHNG, J. S.; McCLEMENTS, D. J.; McLANDSBOROUGH, L. Antimicrobial activity and chemical stability of cinnamon oil in oil-in-water nanoemulsions fabricated using the phase inversion temperature method. **LTW – Food Science and Technology**. v.110, p.190-196, 2019.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), **Conjuntura Mensal Especial, Brasília-DF**, 2017.

CONSTANTINIDES, P. P.; CHAUBAL, M. V.; SHORR, R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.60, p.757-767, 2008.

DIAZ, M. A. N.; ROSSI, C. C.; MENDONÇA, V.R.; SILVA, D.M.; RIBON, A. O. B. AGUIAR, A. P.; MUÑOZ, G. D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.20, n.5, p.724-728, 2010.

DILBATO, T.; BEGNA, F.; JOSHI, R. K. Reviews on challenges, opportunities and future prospects of antimicrobial activities of medicinal plants: alternative solutions to combat antimicrobial resistance. **International Journal of Herbal Medicine**. v.7, n.4, p.10-18, 2019.

DONSÌ, F. & FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**. v.233, p.106-120, 2016.

EL ASBAHANI, MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; AÏT ADDI, E. H.; CASABIANCA, H.; EL MOUSADIK, A.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A. Essential oils: from extraction to encapsulation. **International Journal Pharmaceutics**. v.483, p.220–243, 2015.

ELTAHIR, Y. & HAGER, S. The efficacy of *Acacia nilotica* extract as a disinfectant on addition silicone impressions: An in-vitro study. **International Journal of Herbal Medicine**. v.8, n.5, p.48-52, 2020

EL-SAY, K. M. & EL-SAWY, H. S. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. v.528, p.675-691, 2017.

ENGER, B. D.; BRANCO, R. R.; NICKERSON, S.C.; FOX, L.K. Identification of factors that influence the results of the theta test efficacy tests by meta-analysis. **Journal of Dairy Science**. v.99, n.2, p.9900–9911, 2016.

- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. PH.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**. v.55, 1989.
- FOGSGAARD, K. K.; BENNEDSGAARD, T. W.; HERSKIN, M. S. Behavioral changes in freestall-housed dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**. v.98, p.1-9, 2015.
- FONSECA, C. Fenologia e caracterização fitoquímica do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar. f.113, 2018.
- GADEA, R.; FUENTES, M. A. F.; PULIDO, R. P.; GALVEZ, A.; ORTEGA, E. Effects of exposure to quaternary-ammonium-based biocides on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses in bacteria from organic foods. **Food Microbiology**. v.63, p.58-71, 2017.
- GAKUUBI, M. M.; WANZALA, W.; WAGACHA, M.; DOSSAI, S.F. Bioactive properties of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oils: a review. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**. v.4, n.2, p.27–36, 2016.
- GARCÍA-SALINAS, S.; ELIZONDO-CASTILLO H.; ARRUEBO M.; MENDOZA G.; IRUSTA S. Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of different components of natural origin present in essential oils. **Molecules**. v.23, n.06, p.1399, 2018.
- GARVEY, M.; CURRAN, D.; SAVAGE, M. Efficacy testing of teat dip solutions used as disinfectants for the dairy industry: Antimicrobial properties. **International Journal of Dairy Technology**. v.70, n.2, p.179-187, 2016.
- GIBSON, H.; SINCLAIR, L. A.; BRIZUELA, C. M.; WORTON, H. L.; PROTHEROE, R.G. Effectiveness of selected pre-milking teat-cleaning regimes in reducing teat microbial load on commercial dairy farms. **Letters in Applied Microbiology**. v.46, n.3, p.295-300, 2008.
- GLEESON, D.; FLYN, J.; O'BRIEN, B. Effect of pre-milking teat disinfection on new mastitis infection rates of dairy cows. **Irish Veterinary Journal**. v.71, n.11, 2018.
- GLEESON, D.; O'CONNELL, A.; JORDAN, K. Review of potential sources and control of thermophilic bacteria in bulk-tank milk. **Irish Journal of Agricultural & Food Research**. v.52, n.2, p.217–227, 2013.
- GLEESON, D.; O'BRIEN, B.; FLYN, J.; O'CALLAGHAN, E.; GALLI, F. Effect of pre-milking teat preparation procedures on the microbial count on teats prior to cluster application. **Irish Veterinary Journal**. v.62, n.7, p.461-467, 2009.
- GOMES, F. T. Avaliação do perfil químico do óleo essencial de populações espontâneas de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) na região sul do Rio Grande do Sul. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar. f.45, 2017.

GROUT, L.; BAKER, M. G.; FRENCH, N.; HALES, S. A Review of Potential Public Health Impacts Associated With the Global Dairy Sector. **Geohealth**. v.4, n.2, 2020.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHKMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**. v.2, p.147–157, 2007.

HAMMAD, M. A.; HASSAN, A. H.; SHIMAMOTO, T. Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. **Elsevier Science Direct Food Control**. v.50, p.815–820, 2015.

IBRAHIM, S. R. M.; ABDALLAH, H. M.; EL-HALAWANYD, A. M.; ESMATE, A.; MOHAMED, G. A. Thiotagetin B and tagetannins A and B, new acetylenicthiophene and digalloyl glucose derivatives from *Tagetes minuta* and evaluation of their in vitro antioxidative and anti-inflammatory activity. **Fitoterapia**. v.125, p.78-88, 2018.

JUNG, C. F. & JÚNIOR, A. A. M. Produção leiteira no Brasil e características da bovinocultura leiteira no Rio Grande do Sul. **Revista de História e Geografia Ágora, UNISC-Universidade de Santa Cruz do Sul**. v.19, n.1, p.34-47, 2017.

KEANE, O. M.; BUDD, K. E.; FLYNN, J.; McCOY, F. Pathogen profile of clinical mastitis in Irish milk-recording herds reveals a complex a etiology. **The Veterinary Record**. v.173, n.1, p.17, 2013.

KISSMANN, K.G. & GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Ludwigshaven: BASF. v.2, p.355-6, 1992.

KUMAR, A. V.; RAO, L. V.; KUMAR, M. K.; SRNU, B.; RAO, T. M. Efficacy of udder disinfectants on reduction of bacterial load and certain pathogens of public health significance. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**. v.2, n.1, p147-151, 2012.

KUMAR, R.; PANDEY, A. & VARSHNEY, V.K. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Tagetes minuta* Against Some Fungi of Forestry Importance. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v.9, n.1, p.67-72, 2019.

LAGO, A.; BRUNO, D. R.; LOPEZ-BENAVIDES, M.; LEIBOWITZ, S. Short communication: Efficacy of glycolic acid-based and iodine-based postmilking barrier teat disinfectants for prevention of new intramammary infections in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. v.99, n.9, p.7467–7472, 2016.

LANGVELD, W. T.; VELDHUIZEN, E. J. A; BURT, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical Reviews in Microbiology**. v.40, n.1, p.76-94, 2014.

LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p.512, 2002.

LOVATTO, P. B.; SCHIEDECK, G.; MAUCH, C. R. Extratos aquosos de *Tagetes minuta* (Asteraceae) como alternativa ao manejo agro-ecológico de afídeos em hortaliças. **Interciencia**. v.38, n.9, p.676-680, 2013.

LU, Z.; CHEN, Y.; CHEN, W.; LIU, H.; SONG, Q.; HU, X.; ZOU, Z.; LIU, Z.; DUO, L.; YANG, J.; GONG, W.; WANG, Z.; WU, X.; ZHAO, J.; ZHANG, C.; ZHANG, M.; HAN, L. Characteristics of qacA/B-positive *Staphylococcus aureus* isolated from patients and a hospital environment in China. **The journal of antimicrobial chemotherapy**. v.70, n.3, p 653-657, 2015.

MAES, C.; BOUQUILLON, S.; FAUCONNIER, M. L. Encapsulation of Essential Oils for the Development of Biosourced Pesticides with Controlled Release: A Review. **Molecules**. v.24, n.14, 2019.

MANGALE, M. R.; PATHAK, S. S.; MENE, H. R.; MORE, B. A. Nanoemulsion: as pharmaceutical Overview. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v.33, n.1, p.244-252, 2015.

MARINHO, M. L.; ALVES, M. S.; RODRIGUES, M. L. C.; ROTONDANO, T. E. F.; VIDAL, I. F.; SILVA, W. W.; ATHAYDE, A. C. R. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.64-69, 2007.

MÁRQUEZ, M. L. F.; BURGOS, M. J. G.; AGUAYO, M. C. L.; PULIDO, R. P.; GÁLVEZ, A.; LUCAS, R. A. Characterization of biocide-tolerant bacteria isolated from cheese and dairy small-medium enterprises. **Food Microbiology**. v.62, p.77-81, 2017.

MATOS, C. B. Eficácia de extratos vegetais na desinfecção de superfícies contaminadas com fungos do complexo *Sporothrix*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pelotas. Programa de Pós-Graduação em Veterinária, f.83, 2014.

MEDIASWANTI, K. Influence of Physicochemical Aspects of Substratum Nanosurface on Bacterial Attachment for Bone Implant Applications. **Journal of Nanotechnology**. 6 pages, 2016.

MING, L. C. Coleta de plantas medicinais. In: STASI, D. I. L. (Org.). **Plantas medicinais: arte e ciências – um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE e ANVISA. **Monografia da espécie *Tagetes minuta* L. (cravo-dedefunto)**. f.52, Brasília, 2015. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/11/Monografia-Tagetes-minuta.pdf>

MOHANRAJ, V. J. & CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal Pharmaceutical Research**. v.5, n.1, p.561-573, 2006.

MOREIRA, F. **Plantas que curam. Cuide da sua saúde através da natureza**. Ed.5, p.257, Hemus Editora Limitada. São Paulo, Brasil, 1996.

MORENO, M. I.; NOVOA, M. G. A.; LOVELÍ, M. G. Resistance of pathogenic and spoilage microorganisms to disinfectants in the presence of organic matter and their residual effect on stainless steel and polypropylene. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. v.14, p.197–201, 2018.

MORTON, J. M.; PENRY, J. F.; MALMO, J.; MEIN, G. A. Premilking teat disinfection: is it worthwhile in pasture-grazed dairy herds? **Journal of Dairy Science**. v.97, n.12, p.7525-7537, 2014.

MUREZA, S.; SMIT, C. J.; MUYA, M. C.; NHERERA-CGOKUDA, F. V. Effects of plant extracts as pre-milking dairy cow teat sanitizer. **Journal of Animal & Plant Sciences**. v.31, p.403-408, 2021.

OBLĄK, E.; FUTOMA-KOŁOCH, B.; WIECZYŃSKA, A. Biological activity of quaternary ammonium salts and resistance of microorganisms to these compounds. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.37, n.2, p.22, 2021.

O'BRIEN, B.; GLEESON, D.; JORDAN, K. Concentrations of iodine in milk. **Irish Journal of Agricultural & Food Research**. v.52, n.2, p.209-216, 2013.

O'CONNELL, A.; RUEGG, P. L.; GLEESON, D. Farm management factors associated with *Bacillus cereus* count in bulk tank milk. **Irish Journal of Agricultural & Food Research**. v.52, n.2, p.229-41, 2013.

OIE - World Organisation for Animal Health. Disponível em: <https://www.oie.int/en/for-the-media/onehealth/> Acesso em: 08/09/2020.

OLANDA, G. B.; BEVILAQUA, G. A. P.; SCHUCH, L. F. D.; PRESTES, L. S.; JOB, R. B. Extracts of *Tagetes minuta* L. front of bacteria regarding bovine mastitis. **Comunicata Scientiae**. v.10, n.1, p.1-4, 2019.

OLANDA, G. B. Aplicação do óleo essencial de *Tagetes minuta* (Chinchilho) no tratamento de sementes de feijão. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar. f.115, 2018.

OLIVEIRA, D. H.; ABIB, P. B.; GIACOMINI, R. X.; LENARDÃO, E.J.; SCHIEDECK, G.; WILHELM, E.A.; LUCHESE, C.; SAVEGNANO, L.; JACOB, R.G. Antioxidant and antifungal activities of the flowers' essential oil of *Tagetes minuta*, (Z)-tagetone and thiotagetone. **Journal of Essential Oil Research**. v. 31, n.2, p.160-169, 2019.

OLIVER, S. P.; GILLESPIE, B. E.; LEWIS, M. J.; IVEY, S. J.; ALMEIDA, R. A.; LUTHER, D. A.; JOHNSON, D. L.; LAMAR, K. C.; MOOREHEAD, H.; DOWLEN H. H. Efficacy of a premilking teat disinfectant containing a phenolic combination for the prevention of mastitis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.84, n.6, p.1545–1549, 2001.

OLIVER, S. P.; LEWIS, M. J.; INGLE, T. L.; GILLESPIE, B. E.; MATTHEWS, K. R. Prevention of bovine mastitis by a teat disinfectant containing chlorous acid and chlorine dioxide. **Journal of Dairy Science**. v.76, n.1, p.287–292, 1993.

ORGANIS - Conselho Brasileiro da Produção Orgânica e Sustentável. **Consumo de produtos orgânicos no Brasil**. 2017.

PANKEY, J. W.; WILDMAN, E. E.; DRECHSLER, P. A. et al. Field trial evaluation of premilking teat disinfection. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.4, p.867-872, 1987.

PARK, H.; HONG, M.; HWANG, S.; PARK, Y.; KWON, K.; YOON, J.; SHIN, S.; KIM, J.; PARK, Y. Characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* related to bovine mastitis. **Acta Veterinaria Hungarica** v.62, n.1, p.1-12, 2014.

PAVELA, R. & BENELLI, G. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. **Trends in Plant Science**. v.21, n.12, p.1000–1007, 2016.

PAVONI, L.; PERINELLI, D. R.; BONACUCINA, G.; CESPI, M.; PALIERI, G. F. An Overview of Micro-and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability. **Nanomaterials**. v.10, n.1, p.135, 2020.

PINHEIRO MACHADO, G. T.; VELEIRINHO, M. B.; HONORATO, L. A.; KUHNEN, S. Formulation and evaluation of anti-MRSA nanoemulsion loaded with Achyrocline satureioides: a new sustainable strategy for the bovine mastitis. **Nano Express**. v.1, 2020.

PINHEIRO MACHADO, G. T.; VELEIRINHO, M. B.; MAZZARINO, L.; MACHADO FILHO, L. C. P.; MARASCHIN, M.; CERRI, R. L. A.; KUHNEN, S. Development of propolis nanoparticles for the treatment of bovine mastitis: in vitro studies on antimicrobial and cytotoxic activities. **Canadian Journal of Animal Science**. v.99, p.713-723, 2019.

PINTO, N. O. F.; RODRIGUES, T. H. S.; PEREIRA, R. C. A.; SILVA, L. M. A.; CÁCERES, C. A.; AZEREDO, H. M. C.; MUNIZA, C. R.; BRITO, E. S.; CANUTO, K. M. Production and physico-chemical characterization of nanocapsules of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Industrial Crops and Products**. v.86, p.279–288, 2016.

RAMALHO, A. C.; SOARES, K. D. A.; SILVA, D. F.; BARROS, M. R. C.; JÚNIOR, J. W. P.; OLIVEIRA, J. M. B.; MOTA, R.; MEDEIROS, E. Eficácia in vitro de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a *Staphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira. Pesq. Vet. Bras**. v.32, n.12, p.1285-1288, 2012.

ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; BESSER, T.E. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. **Journal of Dairy Science**. v.77, n.11, p.3354-3364, 1994.

ROWE, S. M.; TRANTER, W. P.; LAVEN, R. A. Effect of pre-milking teat disinfection on clinical mastitis incidence in a dairy herd in Northern Queensland Australia. **Australian Veterinary Journal**. v.96, n.3, p.69-75, 2018.

SAKEENA, M. H. F.; ELRASHID, S. M.; MUNAVVAR, A. S.; AZMIN, M. N. Effects of Oil and Drug Concentrations on Droplets Size of Palm Oil Esters (POEs) Nanoemulsion. **Journal of Oleo Science**. v.60, n.4, p.155-158, 2011.

- SALEHI, B.; VALUSSI, M.; MORAES-BRAGA, M. F. B.; CARNEIRO, J. N. P.; LEAL, A. L. A. B.; COUTINHO, H. D. M.; VITALINI, S.; KREGIEL, D.; ANTOLAK, H.; SHARIF-RAD, M.; SILVA, N. C. C.; YOUSAF, Z.; MARTORELL, M.; IRITI, M.; CARRADORI, S.; SHARIFI-RAD, J. *Tagetes* spp. Essential Oils and Other Extracts: Chemical Characterization and Biological Activity. **Molecules**. v.23, p.2847, 2018.
- SANTANA, H. F.; BARBOSA, A. A. T.; FERREIRA, S. O.; MANTOVANI, H. C. Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *World journal of microbiology & biotechnology*, v.28, n.2, p.485–91, 2012.
- SANTOS, A. S.; ALVES, S. M.; FIGUEIRÊDO, F. J.; ROCHA NETO, O. G. Descrição de sistema e do método de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Comunicado técnico 99- Ministério da Agricultura pecuária e abastecimento** – Belém PA, 2004.
- SANTOS, D. C.; SCHNEIDER, L. R.; BARBOZA, A. S.; CAMPOS, A. D.; LUND, R. G. Systematic review and technological overview of the antimicrobial activity of *Tagetes minuta* and future perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**. v.208, p.8-15, 2017.
- SÃO PEDRO, A.; ESPÍRITO SANTO, I.; SILVA, C. V.; DETONI, C.; ALBUQUERQUE, E. The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**, v.2, p.1364-1374, 2013.
- SATO, Y.; ISHIHARA, M.; NAKAMURA, S.; FUKUDA, K.; KUWABARA, M.; TAKAYAMA, T.; HIRUMA, S.; MURAKAMI, K.; FUJITA, M.; YOKOE, H. Comparison of Various Disinfectants on Bactericidal Activity Under Organic Matter Contaminated Environments. **Biocontrol Science**. v.24, n.2, p.103-108, 2019.
- SCHIAVON, D.B.A.; SCHUCH, L.F.D.; FACCIN, Â.; GONÇALVES, C.L.; VIEIRA, V. S.C.; GONÇALVES, H.P. Revisão sistemática de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae): uso popular, composição química e atividade biológica. **Science and animal health**. v.3, n.2, p.192–208, 2015.
- SCHUCH, L. F. D.; WIEST, J. M.; COIMBRA, H. S.; PRESTES, L. S.; DE TONI, L.; LEMOS, J. S. Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a microrganismos relacionados à mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**. v.9, n.1, p.161-169, 2008.
- SCHUCH, L. F. D.; WIEST, J. M.; COIMBRA, H. S.; PRESTES, L. S.; DE TONI, L.; LEMOS, J. S. Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a microrganismos relacionados à mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**. v.9, n.1, p.161-169, 2007.
- SCHUKKEN, Y.; CHUFF, M.; MORONI, P.; GURJAR, B. A.; SANTISTEBAN, C.; WELCOME, F.; ZADOKS, R. The “Other” Gram-Negative Bacteria in Mastitis *Klebsiella*, *Serratia*, and More. **The Veterinary Clinics of North America. Food animal practice**. v.28, n.2, p.239-256, 2012.

SELL, C. Chemistry of essential oils, in **Handbook of Essential Oils. Science, Technology, and Applications**, K. H. Başer and G. Buchbauer, Eds., p. 121–150, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2010.

SEUGLING, J.; KUHNEN, S.; BARROS, G. P.; VELERINHO, M. B.; MAZZARINO, L.; BRICARELLO, P. A. Development of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) Essential Oil Nanoemulsion and Its Biological Activity on Pre-pupae of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.7, n.6, p.293-308, 2019.

SEVEN, P. T.; SEVEN, I.; BAYKALIR, B. G.; MUTLU, S. I.; SALEM, A. Z. M. Nanotechnology and nano-propolis in animal production and health: an overview. **Italian Journal of Animal Science**. v.17, n.4, p.921-930, 2018.

SHARMA, C.; ROKANA, N.; CHANDRA, M.; SINGH, B. P.; GULHANE, R. D.; GILL, J. P. S.; RAY, P.; PUNIYA, A. K.; PANWAR, H. Antimicrobial Resistance: Its Surveillance, Impact, and Alternative Management Strategies in Dairy Animals. **Frontiers in Veterinary Science**. v.4, 2018.

SILVA, H. O.; LIMA, J. A. S.; AGUILAR, C. E. G.; ROSSI, G. A.M.; MATHIAS, L. A.; VIDAL, A. M. C. Efficiency of Different Disinfectants on *Bacillus cereus* Sensu Stricto Biofilms on Stainless-Steel Surfaces in Contact With Milk. **Frontiers in Microbiology**. v.9, 2018.

SILVA, E. M. G.; RODRIQUES, V. S.; JORGEL, J. O.; OSAVA, C. F.; SZABO, M. P. J.; GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R. Efficacy of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil against *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) on infested dogs and in vitro. **Exp Appl Acarol**. v.70, p.483–489, 2016.

SILVA, J. M. S. Encapsulamento do Óleo Essencial da *Lippia alba* em Nanopartículas de Poli- ϵ -caprolactona (PCL) para Avaliação da Estabilidade e Atividade Larvicida contra o *Aedes aegypti*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Manaus, f.70, 2019.

SINGH, T., SHUKLA, S.; KUMAR, P.; WAHLA, V.; BAJPA, V. K. Application of Nanotechnology in Food Science: Perception and Overview. **Frontiers in Microbiology**. v.8, 2017.

SOUZA, C. A. S.; AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. – *Compositae* (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.37, n.6, p.429-433, 2000.

SPERANDIO, J.; VELEIRINHO, M. B.; HONORATO, L. A.; CAMPESTRINI, L. H.; KUHNEN, S. Atividade antimicrobiana e citotoxicidade in vitro do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. visando à aplicação no controle da mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.71, n.4, p.1251-1259, 2019.

TRONCARELLI, M. Z.; BRANDÃO, H. M.; GERN, J. C.; SÁ GUIMARÃES, A.; LANGONI, H. Nanotechnology and Antimicrobials in Veterinary Medicine. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education** (A. Méndez-Vilas, Ed.) **Formatex**. p.543–556, 2013.

VAN DEN BORNE, B. H. P.; VAN SCHAIK, G.; LAM, T. J. G. M; NIELEN, M; FRANKENA, K. Intramammary antimicrobial treatment of subclinical mastitis and cow performance later in lactation. **Journal of Dairy Science**. v.102, p.1-11, 2019.

WATTS, J.L. & SWEENEY, M.T. Antimicrobial resistance in bovine respiratory disease pathogens: measures, trends, and impact on efficacy. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v.26, n.1, p.79-88, 2010.

YOUSSEF, F. S.; EL-BANNA, H. A.; ELZORBA, H. Y.; GALAL, A. M. Application of some nanoparticles in the field of veterinary medicine. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**. v.7, n.1, p. 78-93, 2019.

ZHANG, D. X.; LI, Y.; YANG, X. Q.; SU, H. Y.; WANG, Q. ZHANG, Z. H.; LIU, Y. C.; TIAN, C. L.; CUI, C. C.; LIU, M. C. In vitro Antibiotic Susceptibility, Virulence Genes Distribution and Biofilm Production of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis in the Liaoning Province of China. **Infection and Drug Resistance**. v.11, n.13, p.1365-1375, 2020.

ZHANG, J.; ZHANG, L.; WANG, M.; BROSTAU, Y.; YIN, C.; DOGOT, T. Identifying key pathways in manure and sewage management of dairy farming based on a quantitative typology: A case study in China. **Science of the Total Environment**. v.760, 2021.

ANEXOS

ANEXO A – Certidão do cadastro de acesso no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº AFAE10F

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro:	AFAE10F
Usuário:	UFSC
CPF/CNPJ:	83.899.526/0001-82
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético/CTA
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Tagetes minuta
 Tagetes minuta L.

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Avaliação da atividade desinfetante de nanocápsulas à base do óleo essencial de Tagetes minuta L. no manejo de ordenha de vacas leiteiras.**

Equipe

DANIELA APARECIDA MOREIRA	UFSC
SHIRLEY KUHNEN	UFSC
LUIZ CARLOS PINHEIRO MACHADO FILHO	UFSC
LUIZ FILIPE DAME SCHUCH	UFPEL
JACKELINE VIEIRA LIMA	UFPEL
LETÍCIA MAZZARINO	UFSC
KARIN POSSEBON BOLZAN	UFSC

Parceiras Nacionais

92.242.080/0001-00 / Fundação Universidade Federal de Pelotas

Data do Cadastro:	10/02/2020 11:27:40
Situação do Cadastro:	Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 12/18 de 16/02/2021



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SISGEN