



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

Gabriela Tasso Bongioiolo Pinheiro Machado

**Desenvolvimento de formas farmacêuticas sustentáveis com nanoemulsão de macela  
(*Achyrocline satureioides*) visando à terapêutica da mastite bovina**

Florianópolis

2021

**Desenvolvimento de formas farmacêuticas sustentáveis com nanoemulsão de macela  
(*Achyrocline satureioides*) visando à terapêutica da mastite bovina**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Shirley Kuhnen

Coorientadoras: Dr<sup>ª</sup>. Maria Beatriz da Rocha Veleirinho  
Dr<sup>ª</sup>. Luciana Aparecida Honorato

Florianópolis

2021

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

Pinheiro Machado, Gabriela Tasso Bongioiolo  
DESENVOLVIMENTO DE FORMAS FARMACÊUTICAS SUSTENTÁVEIS  
COM NANOEMULSÃO DE MACELA (Achyrocline satureioides)  
VISANDO À TERAPÊUTICA DA MASTITE BOVINA : NANOBIOTATIVOS  
VISANDO À TERAPÊUTICA DA MASTITE BOVINA / Gabriela Tasso  
Bongioiolo Pinheiro Machado ; orientadora, Shirley Kuhnen,  
coorientador, Maria Beatriz da Rocha Veleirinho,  
coorientador, Luciana Aparecida Honorato, 2021.  
181 p.

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

Inclui referências.

1. Agroecossistemas. 2. Produtos naturais. 3.  
Nanoemulsão. 4. Hidrogel. 5. Sanidade animal. I. Kuhnen,  
Shirley. II. da Rocha Veleirinho, Maria Beatriz. III.  
Honorato, Luciana Aparecida IV. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Agroecossistemas. V. Título.

Gabriela Tasso Bongioiolo Pinheiro Machado

DESENVOLVIMENTO DE FORMAS FARMACÊUTICAS SUSTENTÁVEIS COM  
NANOEMULSÃO DE MACELA (*Achyrocline satureioides*) VISANDO À  
TERAPÊUTICA DA MASTITE BOVINA

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

Prof<sup>ª</sup>. Daniele Cristina da Silva Kazama, Dr<sup>ª</sup>.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Acácio Antônio Ferreira Zielinski, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Letícia Mazzarino, Dr<sup>ª</sup>.

Nanoscopying

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

---

Prof. Dr. Arcângelo Loss  
Coordenador do Programa

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Shirley Kuhnen  
Orientadora

Florianópolis

2021

## AGRADECIMENTOS

Às diversas contribuições, o êxito alcançado por esta tese é produto de muitas mãos!

À minha família, Thiago e Paulo. Obrigada pelo amor, pela compreensão e por estarem sempre comigo!

Ao Labinat que me acolheu e me ensinou muito.

Aos companheiros e companheiras de lab Roberto, Isadora, Mariana, Samira e Karin pelas ajudas, pelas conversas e por deixarem o percurso mais leve.

Ao Lmbv pela parceria.

Às minhas orientadoras Shirley, Bia e Luciana! Obrigada pela orientação que vai além da rotina profissional, pelo apoio e confiança, vocês são super!

Ao PPGA (Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas) pela oportunidade de realização do doutorado e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento do grande projeto “Produtos Naturais: Alternativa no Controle da Mastite Bovina” Projeto nº 403415 / 2013-6, Edital 39/2013.

## RESUMO

A mastite é uma doença inflamatória altamente prevalente em bovinos leiteiros, causada na maioria das vezes por bactérias. Dificuldades relacionadas ao tratamento da mastite despertam a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias eficazes de controle que possam contemplar os sistemas de produção leiteira convencional, orgânico e agroecológico, colaborando positivamente com questões de saúde pública, saúde humana, saúde animal, qualidade alimentar e ambiental. O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de formas farmacêuticas antimicrobianas inovadoras, i.e., nanoemulsão de macela (*Achyrocline satureioides*) e hidrogel a base de mucilegam de linhaça e k-carragenana veículo da nanoemulsão (nanocompósito) visando à terapêutica da mastite bovina. Quatro nanoemulsões de macela desenvolvidas e selecionadas mostraram tamanho médio de partícula entre 203 a 249 nm, distribuição monodispersa ( $PdI < 0,3$ ), formato esférico e eficiência de encapsulação dos ativos (compostos fenólicos) superior a 94%. A avaliação da atividade antimicrobiana das nanoemulsões de macela ( $n=4$ ) contra bactérias planctônicas *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (SARM) mostrou concentrações inibitórias mínimas (CIM50) entre 1,2 a 5% (v/v). Em termos de citotoxicidade, houve redução de 50% de viabilidade (IC50) das células epiteliais mamárias bovinas (linhagem MAC-T) após exposição a concentrações que variaram de 2,6 a 9,7% (v/v) das nanoemulsões de macela ( $n=4$ ). As concentrações inibitórias mínimas de prevenção da formação de biofilme (CMIB) e de erradicação de biofilmes pré-formados (CMEB) da nanoemulsão de macela mais promissora (NE-ML1:5; 1% de Tween 80 e 5% de óleo de linhaça) foram 25 e 80% (v/v), respectivamente. Na avaliação do tipo de morte celular provocado pela nanoemulsão NE-ML1:5, foi evidenciado efeito citoprotetor sobre as células MAC-T tanto através da prevenção da morte apoptótica ( $\pm 30\%$ ) como necrótica ( $\pm 40\%$ ). A avaliação da capacidade de permeação dos compostos da macela em modelo de células de difusão tipo Franz utilizando explantes da glândula mamária bovina mostrou maior penetração da 3-O metilquercetina e quercetina nanoemulsionados (NE-ML1:5) comparado ao extrato bruto de macela ao longo de 12 h, com um total acumulado de 50 e 111 contra 35 e 48  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente. Os nanocompósitos (NCs) desenvolvidos à base dos polímeros naturais mucilagem de linhaça e k-carragenana nas proporções 8:2, 7:3 e 5:5 (m/m) com 1,25 mg/g de extrato de macela na nanoemulsão (NE-ML1:5) permitiu o aumento da viscosidade desta formulação. Os três NCs apresentaram características termorreversíveis, com viscosidade similar de 1500 cP em temperaturas entre 40 e 30°C. Os três NCs mostraram perfil de liberação dos fenólicos totais gradativo e sustentado em 72 h, com pico em 24 h (NC-5:5) e

48 h (NCs 7:3 e 8:2). Os NCs 5:5, 7:3 e 8:2 mostraram pico de liberação da 3-O-metilquercetina e da Achyrobichalcona em 72 h. Os três NCs inibiram o crescimento de *S. aureus* (ATCC 33592) com efeito bactericida até 8 h de incubação. A atividade anti-SARM avaliada por microdiluição em caldo mostrou concentração inibitória mínima (CIM) de 312 µg/mL para o NC-5:5 e de 625 µg/mL para o NC-8:2 e NC-7:3. Não foram encontrados efeitos tóxicos dos compósitos hidrogéis não carregados com a nanoemulsão de macela sobre as células MAC-T. Diante dos resultados obtidos pode-se sugerir que a nanomemulsão de macela e os nanocompósitos desenvolvidos mostraram importantes atividades biológicas, *i.e.*, antimicrobiana, antibiofilme, citoprotetora, maior capacidade de penetração e liberação prolongada dos ativos nas condições *in vitro* estudadas, viabilizando avaliações *in vivo* na terapêutica e prevenção da mastite bovina. Em conjunto, os materiais desenvolvidos representam formas farmacêuticas candidatas para o tratamento da mastite bovina visando reduzir as infecções subclínicas através do uso intramamário. Destaca-se que os materiais inovadores totalmente desenvolvidos a base de produtos naturais podem ainda impactar a saúde, o bem-estar animal e a sustentabilidade da produção leiteira nos diversos sistemas de produção.

**Palavras-chave:** *Achyrocline satureioides*, *Linum usitatissimum* L., fitoterápico, nanoemulsão, compósitos hidrogéis, antimicrobiano, mastite, macela.

## ABSTRACT

Mastitis is an inflammatory disease highly prevalent in dairy cattle, most often caused by bacteria. Difficulties related to the treatment of mastitis require the development of new effective control strategies that can contemplate conventional, organic and agroecological dairy production systems, collaborating positively with issues of public health, human health, animal health, food and environmental quality. The aim of this study was to develop innovative antimicrobial pharmaceutical forms, i.e., nanoemulsion and macela-nanocomposite (*Achyrocline satureioides*) candidates for bovine mastitis treatment. Four macela-nanoemulsions developed showed a mean particle size between 203 to 249 nm, monodisperse distribution (PDI <0.3), spherical shape and encapsulation efficiency values (phenolic compounds) higher than 94%. The antimicrobial activity of macela-nanoemulsions (n=4) against planktonic bacteria methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (SARM) showed minimum inhibitory concentrations (MIC50) between 1.2 to 5% (v/v). In terms of cytotoxicity, there was a 50% reduction in viability (IC50) of bovine mammary epithelial cells (MAC-T lineage) after exposure to macela-nanoemulsions at concentrations ranging from 2.6 to 9.7% (v/v) (n=4). The minimum inhibitory concentrations for preventing biofilm formation (MBIC) and eradicating preformed biofilms (MBEC) of the most promising macela-nanoemulsion (NE-ML1:5; 1% Tween 80 and 5% linseed oil) were 25 and 80% (v/v), respectively. The type of cell death caused by the NE-ML1:5 nanoemulsion, a cytoprotective effect on MAC-T cells was showed both through the prevention of apoptotic ( $\pm 30\%$ ) and necrotic ( $\pm 40\%$ ) death. The permeation capacity of the compounds of the macela (NE-ML1:5) in a Franz diffusion cell model using bovine mammary gland explants showed greater penetration of nanoemulsified 3-O methylquercetin and quercetin compared to crude extract along 12h, with a final permeated amount of  $50.7 \pm 3.2$  and  $111.2 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  compared to  $35.0 \pm 0.6$  and  $48.9 \pm 1.2$ , respectively. The nanocomposites (NCs) developed based on natural polymers, i.e., linseed mucilage and k-carrageenan in the proportions 8:2, 7:3 and 5:5 (w/w) with 1.25 mg/g of macela extract in the nanoemulsion (NE-ML1:5) allowed an increase in the viscosity of this formulation. NCs showed thermoreversible characteristics, with a similar viscosity of 1500 cP at temperatures between 40 and 30°C. NCs showed a gradual and sustained release profile of total phenolics in 72h, with a peak in 24h (NC-5:5) and 48h (NCs 7:3 and 8:2). The NCs 5:5, 7:3 and 8:2 showed a peak release of 3-O-methylquercetin and Achyrobichalcona in 72h. NCs inhibited the growth of *S. aureus* (ATCC 33592) with a bactericidal effect until 8h. The anti-SARM activity evaluated by broth microdilution showed a minimum inhibitory concentration

(MIC) of 312 µg/mL for NC-5:5 and 625 µg/mL for NC-8:2 and NC-7:3. No toxic effects were found for unloaded hydrogel composites on MAC-T cells. The results show that the macela-nanomeulsion and the developed nanocomposites showed important biological activities, i.e., antimicrobial, antibiofilm, cytoprotective, increased permeation and prolonged release of the phenolics in the *in vitro* studied conditions, allowed *in vivo* studies in therapy and prevention of bovine mastitis. The materials developed represent candidate pharmaceutical forms for the treatment of bovine mastitis aiming to reduce subclinical infections through intramammary use. It is noteworthy that the innovative materials entirely based on natural products can also impact the health, welfare and the sustainability of dairy production in different production systems.

**Keywords:** *Achyrocline satureioides*, *Linum usitatissimum* L., phytotherapeutic, nanoemulsion, hydrogel composites, antimicrobial, mastitis, macela.

## LISTA DE ABREVIACÕES

3-Ometil- 3-O-metilquercetina

ACB-achyrobichalcona

ATCC- American Type Culture Collection (Coleção Americana de Tipos de Culturas)

BHI- Brain Heart Infusion (Infusão de cérebro e coração)

CIM- Concentração inibitória mínima

CLAE- Cromatografia líquida de alta eficiência

CMEB- Concentração mínima de erradicação do biofilme

CMIB- Concentração mínima de inibição do biofilme

DMSO- Dimetilsulfóxido

FTIR- Espectroscopia de Infravermelho

HAP- Homogeneização por alta pressão

IC<sub>50</sub>- Concentração inibitória de 50% das células

LABINAT- Laboratório de Bioquímica e Produtos naturais

LMBV- Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal

LUT- Luteolina

MAC-T- Mammary Alveolar Cell-T (Células Alveolares Mamárias T)

MTT- Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil

NCs- Nanocompósitos carregados com a nanoemulsão de macela

NE-ML- Nanoemulsão de linhaça carregada com extrato de macela

NE-ML1:5- Nanoemulsão de óleo de linhaça carregada com extrato de macela composta por 1% de tween 80, 5% de óleo de linhaça e 2,5 mg/mL de extrato de macela

NE-OL- Nanoemulsão de óleo de linhaça

PdI- Índice de polidispersão

Q- Quercetina

SC- Santa Catarina

TEM- Microscopia eletrônica de transmissão

TVS- Terapia da Vaca Seca

UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina

UNCs- Nanocompósitos não-carregados com a nanoemulsão

UV-VIS- Ultravioleta visível

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	12
OBJETIVO GERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
Glândula Mamária.....	19
Mastite.....	21
Mastite Bovina Subclínica por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	26
Plantas Medicinais .....	30
Plantas Medicinais no Tratamento da Mastite Bovina.....	33
Macela.....	37
Nanotecnologia na Produção Animal.....	41
Desenvolvimento de nanoemulsões.....	44
Nanoemulsões na Saúde Animal.....	47
Hidrogéis poliméricos.....	49
Polímeros naturais na mastite bovina.....	53
<b>CAPÍTULO 2: Formulation and evaluation of anti-MRSA nanoemulsion loaded with <i>Achyrocline satureioides</i>: a new sustainable strategy for the bovine mastitis.....</b>	<b>56</b>
<b>CAPÍTULOS 3: <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC. extract-loaded nanoemulsions for treating bovine mastitis: protective properties and polyphenol permeation studies through mammary epithelium.....</b>	<b>88</b>
<b>CAPÍTULO 4: Nanocompósitos de mucilagem de linhaça e k-carragenana carregados com nanoemulsão de <i>Achyrocline satureioides</i>: um antimicrobiano de liberação gradual candidato para o tratamento de mastite bovina.....</b>	<b>112</b>
<b>CAPÍTULO 5: DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>151</b>
<b>CAPÍTULO 6: CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>155</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTAR.....</b>	<b>156</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>165</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>167</b>

## INTRODUÇÃO

Considerada um dos principais problemas sanitários que afeta a cadeia produtiva do leite, a mastite ocorre em praticamente todas as unidades agropecuárias e causa grandes prejuízos à atividade (Guimarães et al., 2017). A mastite bovina representa uma doença de difícil tratamento em sistemas convencionais de produção, o que tem levado ao mau uso de medicamentos, e principalmente, representa um obstáculo em sistemas sustentáveis de produção leiteira, i.e., orgânico e agroecológico, os quais possuem disponibilidade limitada de tratamentos eficazes e seguros e restrições de uso de antimicrobianos impostas pela legislação. Consequências relacionadas à dificuldade de tratamento da doença têm levado à persistência de resíduos antimicrobianos no leite, ao desenvolvimento de resistência pelos microrganismos contra diversos princípios ativos de fármacos e ao uso de práticas populares, sem critérios, que podem agravar ainda mais o quadro clínico do animal (Oliveira et al., 2012; Vieira et al., 2012; Feng et al., 2016; Mushtaq et al., 2018). A crise de resistência aos antimicrobianos tem sido considerada uma das questões mais urgentes na saúde pública global, associada à falta de novos antimicrobianos (OMS, 2017; Baptista et al., 2018). Esses fatos despertam a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias mais eficazes de controle de doenças microbianas, a exemplo da mastite. Antimicrobianos de base natural nanoestruturados são candidatos em potencial (Baptista et al., 2018).

A mastite pode se desenvolver na forma clínica ou subclínica, sendo a maioria das infecções diagnosticadas na forma subclínica, as quais apresentam sintomatologia menos evidente (Radostitis, 2006). Um programa efetivo de controle da mastite deve ter como base, inicialmente, medidas de prevenção, devendo-se prezar pela saúde da glândula mamária e consequente bem-estar do rebanho. Porém, após o diagnóstico de infecções já estabelecidas, o tratamento da mastite bovina pode ser realizado por diferentes formas que preveem o uso de antimicrobianos sistêmicos e intramamários, combinados ou não (Radostitis, 2006).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* sp. são importantes agentes etiológicos causadores de mastite e estão relacionadas com infecções de longa duração, com baixa taxa de cura e com grande perda da produção de leite, especialmente quando causadas por *Staphylococcus aureus* (Sabour et al., 2004). *S. aureus* possui características próprias como capacidade de escapar da resposta imune do hospedeiro (primeira forma de defesa contra infecções), sobrevivência intracelular, aderência ao epitélio mamário, bem como a capacidade de formação de biofilmes, apresentada por algumas linhagens (Erskine et al.,

2003; Gruet et al., 2001; Hébert et al., 2000). Aproximadamente 50% das cepas de *S. aureus* isoladas de bovinos doentes produzem beta-lactamase, e também são responsáveis pela formação de microabscessos e atrofia do tecido glandular ao redor do local infectado, dificultando a penetração dos antimicrobianos nas membranas fibrosas (Algharib et al., 2020). Todos esses fatores citados acima estão relacionados com a dificuldade do tratamento da mastite causada por este patógeno.

Nesse contexto, o isolamento de *S. aureus* resistente à meticilina (SARM) de rebanhos bovinos leiteiros tem sido relatado com uma prevalência que pode variar de 1 até 60% (Locatelli et al., 2017; Spohr et al., 2011). Também se observa a ocorrência de transmissão de SARM entre animais e trabalhadores rurais em contato com o rebanho. Essa transmissão tem sido associada a casos de infecções da pele, endocardite e pneumonia (Soavi et al., 2010). A presença de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite comercial tem sido relatada em diversas pesquisas nas quais associam este fato a consequências diretas na saúde humana (Nero et al., 2007; Da Silva Maluf et al., 2012; Vieira et al., 2012). Estes dados constituem motivo de preocupação em relação à segurança alimentar e à saúde pública.

Durante a lactação, o uso de antimicrobianos como tratamento da mastite causada por *S. aureus* tem sido considerado pouco eficaz e oneroso, com baixa taxa de sucesso, pois a eliminação completa dos microrganismos raramente é alcançada (Quinn et al., 2005). Maiores taxas de cura têm sido encontradas com o uso de antimicrobianos intramamários no período seco (período improdutivo) (Quinn et al., 2005; Langoni et al., 2017). A terapia de vaca seca (TVS) visando prevenir e tratar a mastite consiste em introduzir na mama produtos antimicrobianos específicos no intervalo entre lactações, imediatamente após a última ordenha. Esta terapia tem sido reconhecida pelo seu potencial de curar no período seco as infecções ocorridas na lactação e prevenir novas infecções (Quinn et al., 2005). Esse procedimento quando combinado com adequado manejo sanitário pode ter sucesso na prevenção e redução das mastites. As taxas de eliminação de *S. aureus* atingidas na TVS podem variar de 25 a 75% (Quinn et al., 2005). Entretanto, destaca-se que em sistemas de produção de leite orgânico e agroecológico, o tratamento da mastite em bovinos tanto na lactação quanto no período improdutivo representa um desafio, uma vez que a maioria dos produtos utilizados tem evidências científicas limitadas de eficácia, baseada em práticas populares.

Nesse contexto, destaca-se a importância do desenvolvimento de novas alternativas mais eficazes e com eficácia científica comprovada para o controle da doença. O desenvolvimento de antimicrobianos nanoestruturados a base de plantas medicinais pode representar uma alternativa capaz de colaborar positivamente com as questões de saúde animal e de saúde pública, contornando os problemas expostos e atendendo às demandas dos sistemas alternativos de produção de leite.

As plantas medicinais são utilizadas desde a antiguidade pelos seres humanos para tratar diversos problemas, servindo inclusive de alicerce para a medicina tradicional. Elas são fonte de uma grande variedade de compostos químicos que podem agir de forma individual, aditiva ou sinérgica, sendo esta capaz de contribuir com o aumento da eficácia terapêutica. O interesse no uso desses compostos tem aumentado devido às diversas atividades biológicas que apresentam, com destaque para a atividade antimicrobiana contra patógenos gram-positivos e gram-negativos (Avancini et al., 2016; Fiordalisi et al., 2018a; Pinheiro Machado et al., 2019; Khan et al., 2017).

Dentre uma ampla diversidade de plantas descritas com reconhecida ação antimicrobiana, destaca-se a macela, selecionada com base em estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa do LABINAT (CCA/UFSC; Fiordalisi, 2018a). A macela (*Achyrocline satureioides*) é utilizada como erva medicinal, principalmente na América do Sul e apresenta atividades biológicas de interesse à terapêutica da mastite bovina, como ação antimicrobiana combinada à reduzida toxicidade (Arredondo et al., 2004; Retta et al., 2012; Kumar et al., 2016; Salgueiro et al., 2016; Fiordalisi, 2018a). No entanto, assim como todos os produtos naturais, a macela também apresenta limitações de uso na forma de extrato, com destaque para a rápida degradação de seus compostos ativos, i.e, metabólitos secundários, quando expostos à luz, temperatura e oxigênio (Brandão, 2011; Troncarelli et al., 2013; Harwansh et al., 2019). Buscando contornar tais limitações, a nanotecnologia surge como uma ferramenta importante capaz de conferir novas características aos extratos vegetais, como menor degradabilidade, maior estabilidade e efetividade (Bidone et al., 2014; Harwansh et al., 2019). Através desta ciência, por exemplo, tem-se a possibilidade de desenvolvimento de nanoemulsões de tamanho reduzido capazes de conferir proteção e estabilidade aos princípios ativos através do seu encapsulamento. Pode-se também direcionar sua liberação a locais de ação específicos e aumentar o poder de penetração dos compostos de interesse (Mohanraj et al., 2006), resultando em medicamentos mais eficazes (Riviere, 2007). Assim, através da associação da macela com a nanotecnologia para o

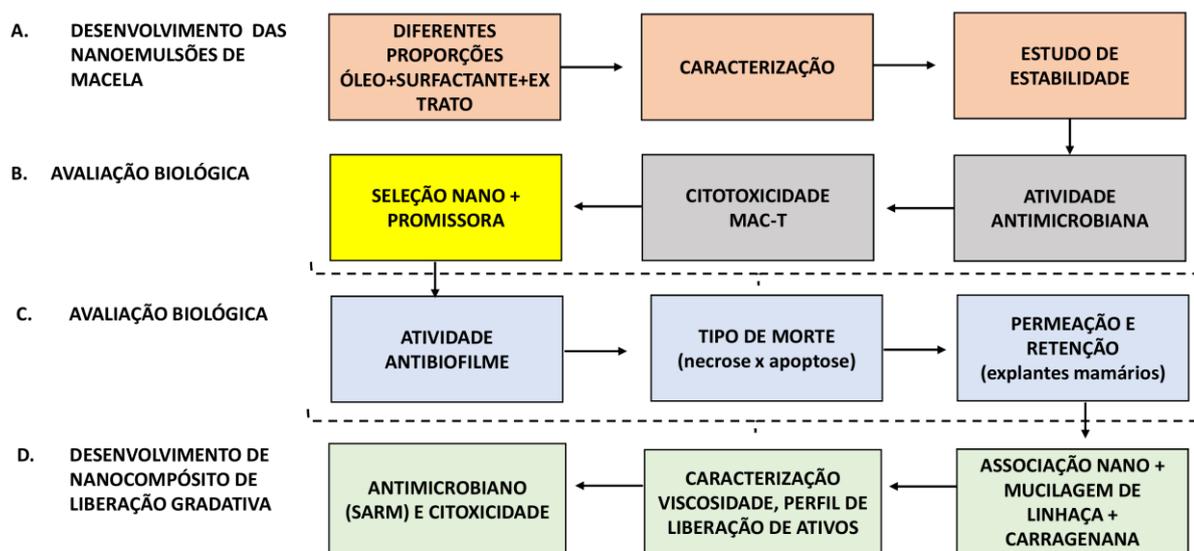
desenvolvimento de nanoemulsões antimicrobianas pode-se obter um sistema ainda mais promissor por potencializar os efeitos esperados através da maior capacidade de alcance e penetração dos ativos.

As nanoemulsões consistem em uma fina dispersão de óleo em água, estabilizada por um surfactante, e apresentam diâmetro de partículas entre 100 e 600 nm (Bouchemal et al., 2004). No seu desenvolvimento, diversos tipos de óleos podem ser utilizados, a exemplo dos óleos vegetais, como o óleo de linhaça, produto natural com potencial promissor e reconhecidas atividades biológicas (Bajerski et al., 2016). Nesse sentido, considera-se promissor o desenvolvimento de nanoemulsão do extrato de macela em óleo de linhaça, buscando a proteção e a maior efetividade dos compostos ativos presentes no extrato, interessantes para o tratamento da mastite bovina. No entanto, visando o tratamento da doença, principalmente durante o período seco (TVS), um maior tempo de permanência dos ativos no interior da glândula mamária, combinado com a proteção e a liberação gradativa dos ativos também é importante. Para tanto, a adequação da viscosidade da nanoemulsão é fundamental. Nesse contexto, compósitos de hidrogéis poliméricos desenvolvidos através da combinação de dois produtos naturais i.e., a k-carragenana e a mucilagem de linhaça, podem conferir propriedades de interesse a esta aplicação (Chen et al., 2006; Monteiro, 2014). Além disso, o uso popular da mucilagem de linhaça em sistemas de produção de leite agroecológicos tem sido considerado visando à prevenção da mastite (Foldenauer, 2016; Rech, 2018; CPRA, 2019). Portanto, para além do desenvolvimento da nanoemulsão de macela, buscou-se também a sua incorporação em compósitos hidrogéis desenvolvidos a base de k-carragenana e mucilagem de linhaça visando à liberação gradativa dos ativos antimicrobianos. O desenvolvimento deste nanocompósito antimicrobiano inovador a base de produtos naturais pode conferir maior tempo de ação, liberação gradativa dos ativos e potencial de uso na terapêutica da mastite bovina no período improdutivo dos animais, principalmente na produção de leite orgânico e agroecológico. A combinação da mucilagem de linhaça com a k-carragenana e nanoemulsão de macela para a obtenção deste material não é descrita na literatura até o momento, evidenciando o caráter inovador deste trabalho.

Considerando o exposto, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de formas farmacêuticas antimicrobianas sustentáveis, i.e., nanoemulsão e nanocompósito de macela (*Achyrocline satureioides*) visando à terapêutica da mastite bovina causada principalmente por *S. aureus* resistente à meticilina.

A presente tese foi estruturada em função das etapas de desenvolvimento do trabalho e organizada na forma de capítulos. Uma revisão bibliográfica envolvendo os temas norteadores da pesquisa, buscando estabelecer conceitos e relações entre a mastite bovina, os principais problemas relacionados a esta doença, o seu impacto na saúde pública, alternativas de tratamento e como os produtos naturais e a nanotecnologia podem contribuir neste cenário foi apresentada no Capítulo 1. O Capítulo 2 mostrou os avanços iniciais do estudo, o qual traz detalhes da realização das etapas de desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões contendo o extrato de macela (*Achyrocline satureioides*) em óleo de linhaça dourada (*Linum usitatissimum*), seguido das avaliações *in vitro* das atividades antimicrobiana e antibiofilme. Os resultados deste estudo foram publicados no periódico Nano Express. O Capítulo 3 mostrou a avaliação *in vitro* do potencial citotóxico e citoprotetor das nanoemulsões de macela em células epiteliais mamárias bovinas e a capacidade de permeação dos compostos fenólicos do extrato na nanoemulsão mais promissora em epitélio glandular mamário bovino. O Capítulo 4 mostrou os estudos da adequação da viscosidade da nanoemulsão de macela através da sua incorporação nos compósitos hidrogéis desenvolvidos a base de k-carragenana e mucilagem de linhaça visando à liberação gradativa dos ativos antimicrobianos *in vitro*. Um capítulo de encerramento, Capítulo 5, reuniu de forma conjunta os resultados de todos os ensaios e estudos, apresentando uma discussão geral e perspectivas de estudos futuros.

O fluxograma a seguir ilustra de forma resumida o delineamento sequencial dos estudos realizados:



## OBJETIVO GERAL

Desenvolver formas farmacêuticas antimicrobianas sustentáveis, *i.e.*, nanoemulsão de macela (*Achyrocline satureioides*) e hidrogel a base de mucilegam de linhaça e k-carragenana como veículo da nanoemulsão (nanocompósito) visando à terapêutica da mastite bovina causada por *S. aureus* resistente à meticilina.

### Objetivos Específicos

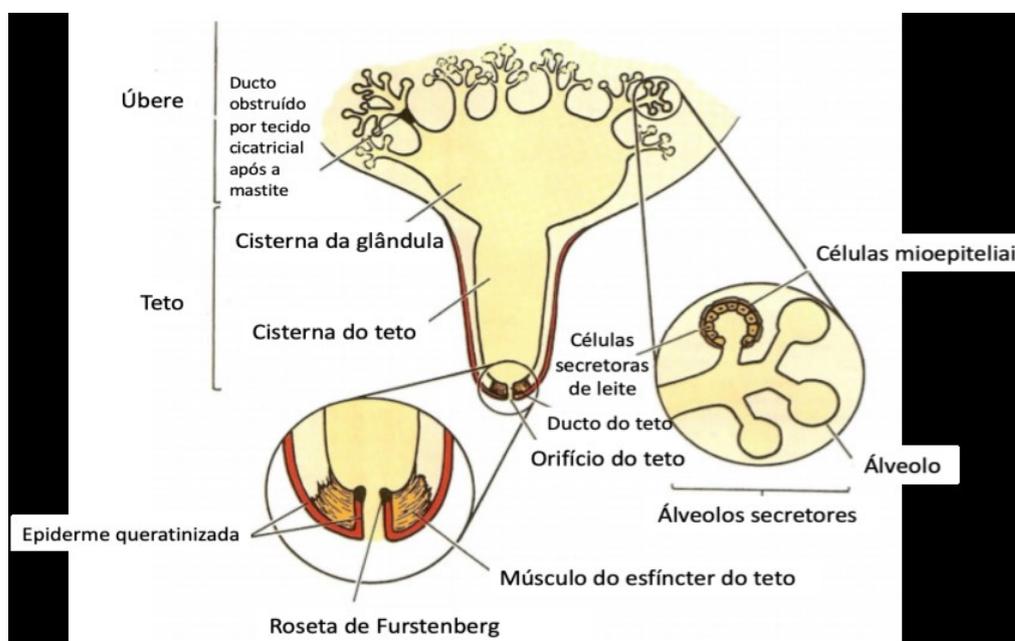
- ✓ Desenvolver e caracterizar nanoemulsões contendo o extrato de macela em óleo de linhaça quanto a estabilidade, tamanho médio de partícula, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta, pH, morfologia e eficiência de encapsulação;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme das nanoemulsões de macela contra cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ATCC 33592 (meticilina-resistente) e isolados de leite mastítico (meticilina-resistentes);
- ✓ Avaliar a citotoxicidade e o tipo de morte *i.e.*, necrose x apoptose, das células epiteliais da glândula mamária bovina (linhagem MAC-T) após exposição às nanoemulsões de macela;
- ✓ Avaliar o tipo de morte, *i.e.*, necrose x apoptose, das células MAC-T desafiadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após exposição prévia à nanoemulsão de macela;
- ✓ Avaliar e comparar a capacidade de permeação e retenção dos ativos fenólicos da nanoemulsão de macela, *i.e.*, quercetina, luteolina e 3-O metilquercetina e do extrato bruto em modelo bicompartimental de célula de difusão tipo Franz, usando explantes mamários bovinos como membrana;
- ✓ Desenvolver e caracterizar nanocompósitos hidrogéis utilizando mucilagem de linhaça e k-carragenana contendo a nanoemulsão de macela quanto à viscosidade e por espectroscopia de infravermelho (FTIR);
- ✓ Avaliar o perfil de liberação da nanoemulsão de macela incorporada nos nanocompósitos hidrogéis;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana dos nanocompósitos hidrogéis contra a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 33592 (meticilina-resistente) e isolados de leite mastítico (meticilina-resistentes);
- ✓ Avaliar a citotoxicidade dos compósitos hidrogéis não carregados com a nanoemulsão de macela sobre células epiteliais mamárias bovinas (linhagem MAC-T).

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## Glândula mamária

As glândulas mamárias têm origem no ectoderma embrionário e conferem aos mamíferos a habilidade de nutrir suas crias. Desenvolvem-se aos pares, que em bovinos são dois, em posição inguinal, e correspondem ao úbere. Assim, o úbere da vaca consiste em quatro glândulas individuais chamadas de quartos. Todo leite de um teto é produzido pelo tecido glandular daquele quarto (Frandsen et al., 2005). Cada glândula é composta por um sistema de ductos que conectam massas de epitélio secretor envolvido por tecido conjuntivo e gordura e sustentado por uma cápsula fibroelástica (Frandsen et al, 2005). A Figura 1 retrata a anatomia do úbere e do teto.

**Figura 1.** Anatomia da glândula mamária bovina, úbere e teto. Fonte: Adaptada de Blowey & Edmondson (1999).



Mecanismos hormonais controlam a proporção entre parênquima secretor e tecido conjuntivo e, durante a lactação, os tecidos secretores da glândula mamária aumentam de volume (Frandsen et al, 2005). Quando a mama está seca, os tecidos secretores regridem e o tecido conjuntivo se constitui numa maior porcentagem da glândula, com conseqüente absorção do leite residual e redução no número de alvéolos (Feitosa, 2004). Os alvéolos são estruturas ocas e circulares responsáveis pela secreção de leite, sendo formados por uma camada única de células. São recobertos por células contráteis mioepiteliais que respondem ao reflexo de ejeção do leite, se contraindo quando o hormônio ocitocina circula.

Organizam-se em unidades conhecidas como lóbulos que se agrupam em unidades maiores denominadas de lobos. O leite é drenado dos ductos principais para a cisterna da glândula e desta para a cisterna do teto que tem capacidade para conter de 30 a 40 mL de leite. A crista circular faz a comunicação entre as duas cisternas. O canal do teto faz comunicação da cisterna do teto com o exterior. A cisterna da glândula tem entre oito e doze ductos galactófaros que veiculam o leite produzido nos alvéolos secretores, e são mantidos em posição pelo tecido conjuntivo, formando o estroma da glândula. Quando acontece uma inflamação, o estroma reage às ações irritantes com proliferação celular e formação de tecido fibroso cicatricial, que em casos mais graves leva a atrofia, endurecimento da glândula e perda de função (Feitosa, 2004).

Em termos anatômicos, a glândula mamária possui seus próprios mecanismos de defesa contra as infecções. O orifício do teto e seu canal, por exemplo, constituem as primeiras barreiras, assim como a descamação de células queratinizadas da superfície epitelial do canal do teto contribui para o mecanismo de remoção de bactérias deste local. A presença de ácidos graxos presentes na camada queratinizada pode também exercer efeito bacteriostático (Quinn et al., 2005; Blowey & Edmondson, 1999). A ação do fluxo do leite ao longo da glândula também age como um importante mecanismo de defesa natural, bem como a frequência de ordenhas e o comprimento dos tetos (Quinn et al., 2005; Blowey & Edmondson, 1999).

O canal do teto tem geralmente 8,5 mm de comprimento e seu lúmen normalmente está fechado por pregas do epitélio que se projetam para dentro da parede do canal, deixando apenas uma abertura em forma de estrela (Frandsen et al., 2005). O orifício do teto possui detalhes anatômicos que impedem a penetração das bactérias na cisterna do teto. Seu epitélio de revestimento é secretor de muco que ajuda a fechar esse conduto, impedindo a penetração de bactérias para o interior das cavidades da glândula (Feitosa, 2004). As vacas cujos dutos dos mamilos são curtos e as que têm um diâmetro amplo da seção transversal são mais susceptíveis a infecções como a mastite (Blowey & Edmondson, 1999). Alguns fatores como os sistemas de produção em confinamento e alguns tipos de sistemas de ordenha podem também favorecer a penetração dos agentes infecciosos na glândula mamária através de seu canal, podendo ocorrer transmissão através da ordenhadeira e pelas mãos do ordenhador. Uma vaca contaminada com *S. aureus*, por exemplo, pode contaminar a pele do úbere de seis a oito vacas seguintes no processo de ordenha (Blowey & Edmondson, 1999). Os microrganismos também podem alcançar o tecido mamário através

de lesões ou feridas na superfície do úbere, assim, os microrganismos que comumente estariam fora da glândula tornam-se capazes de penetrar (Cunningham & Klein, 2008). Além disso, outra causa de mastite é o trauma ao canal dos tetos causado pela repetitiva manipulação durante o processo de ordenha. Ao analisar 11 propriedades produtoras de leite bovino em Pernambuco, Ruiz et al. (2011), verificaram que a contaminação por microrganismos patogênicos é diferente de acordo com o sistema de ordenha adotado. Para ordenha manual a prevalência de *S. aureus* foi de 29,6% e para ordenha mecânica foi de 36,4%. Neste estudo, rebanhos ordenhados mecanicamente tiveram maior prevalência de mastite subclínica diagnosticado por *California Mastitis Test* (CMT), CCS e cultura bacteriológica.

Além dos aspectos anatômicos, a glândula mamária dispõe de importantes mecanismos de defesa celulares para combater a mastite. São os neutrófilos as principais células envolvidas na eliminação de bactérias da glândula mamária. O deslocamento de neutrófilos do sangue para o local da infecção dá início à resposta inflamatória. Eles atuam mediante fagocitose de bactérias invasoras matando-as pelo sistema dependente ou independente de oxigênio (Quinn et al., 2005; Blowey & Edmondson, 1999). Para se estabelecerem na glândula mamária e iniciarem o processo infeccioso, os patógenos necessitam inicialmente resistir à resposta imune inata, que é a defesa predominante no início da infecção e representada por barreiras anatômicas, solúveis e celulares (Carneiro et al., 2009). Conforme Cunningham & Klein (2008), a glândula mamária é um exemplo de tecido onde a resposta inflamatória é geralmente prejudicial à função do mesmo. Consequentemente, as abordagens terapêuticas de combate à mastite devem prever a combinação de agentes anti-inflamatórios e antimicrobianos, propriedades biológicas comumente encontradas através da ação sinérgica dos produtos naturais.

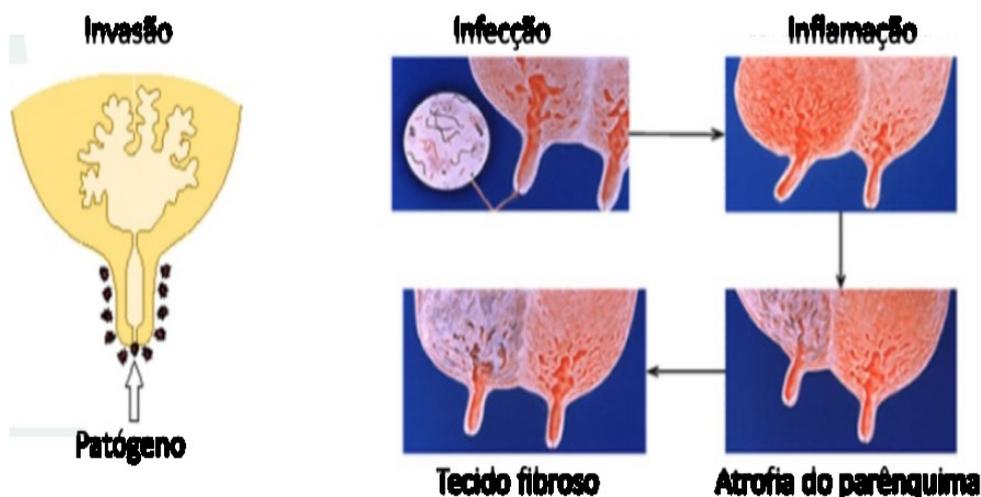
### ***Mastite***

A mastite por definição consiste em um processo inflamatório da glândula mamária causado na maioria das vezes por bactérias (Radostitis, 2006). A mastite pode resultar em alterações patológicas no tecido glandular e uma série de modificações físico-químicas no leite tais como alteração de coloração, aparecimento de coágulos e presença de grande número de leucócitos (Radostitis, 2006). É considerada a principal e mais frequente doença que acomete os rebanhos bovinos leiteiros, sendo responsável por perdas produtivas e econômicas significativas (Erskine et al., 2003; Guimarães et al., 2017). Tais perdas

relacionam-se à diminuição da produção, aos gastos com antimicrobianos e, eventualmente, ao descarte do animal (Gehring & Smith, 2006). Estima-se que no rebanho brasileiro a prevalência da doença seja de 20 a 38%, o que representaria uma perda de 12 a 15% da produção (Embrapa Gado de leite, 2011). Os principais microrganismos causadores de mastite podem ser agrupados em dois grupos: agentes das mastites contagiosas e agentes das mastites ambientais, que diferenciam-se quanto à origem e ao modo de transmissão (Fraser, 1996; Radostitis et al., 2006). A glândula mamária é o principal reservatório de agentes infecciosos que causam mastite contagiosa, o que está associado à transmissão dos microrganismos contagiosos principalmente durante a ordenha (Quinn et al., 2005). Nesse grupo destacam-se *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium bovis* (Fraser, 1996; Radostitis et al., 2006). Por sua vez, os microrganismos causadores de mastite ambiental estão presentes em várias fontes do ambiente, como água, fezes, solo, entre outros e a contaminação do final do teto é um fator importante que predispõe o desenvolvimento da mastite ambiental (Quinn et al., 2005). Nesse grupo destacam-se os patógenos gram negativos, i.e., *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, e espécies de *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae* (Fraser, 1996; Radostitis et al., 2006). *Escherichia coli* e *Streptococcus uberis* são os microrganismos mais frequentemente isolados a partir de casos de mastite clínica em vários países (Quinn et al., 2005).

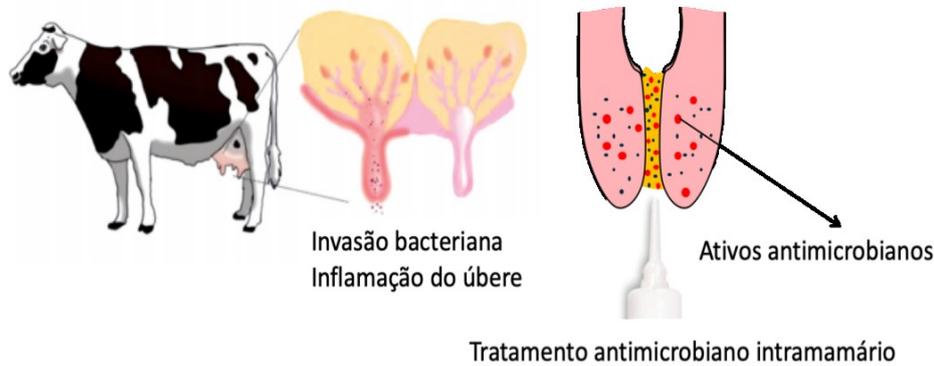
A doença pode se desenvolver na forma subclínica ou clínica, sendo que a maioria das infecções diagnosticadas pertencem a forma subclínica. A mastite clínica ocorre com diferentes graus de efeitos clínicos do úbere e com diversos efeitos sistêmicos, como aumento de temperatura, inchaço acentuado, gangrena, abscessos e atrofia da glândula mamária em alguns casos crônicos (Radostitis et al., 2006). Por ter os sintomas evidentes, o diagnóstico da mastite clínica é mais fácil. Já a mastite subclínica é uma doença silenciosa caracterizada pela diminuição da produção leiteira, com sintomatologia menos evidente quando comparada à mastite clínica (Radostitis et al., 2006). O diagnóstico da mastite subclínica necessita de testes específicos, de campo ou laboratório, que confirmam a existência do processo inflamatório (Acosta et al., 2016). A prevalência da mastite subclínica é muito variável, mas pode chegar a valores próximos de 50% na espécie bovina no Brasil (Acosta et al., 2016). O desenvolvimento da mastite é descrito por Radostitis et al. (2006), como um processo complexo que envolve três estágios: invasão, infecção e inflamação (Figura 2).

**Figura 2.** Etapas da infecção da glândula mamária. Fonte: Adaptado de Embrapa 2011.



Invasão é o estágio no qual o patógeno se move da extremidade do teto para o leite no interior do canal do teto. Infecção é o estágio em que os patógenos se multiplicam rapidamente e invadem o tecido da glândula mamária. A inflamação representa o estágio em que a mastite ocorre com diferentes graus de efeitos locais e sistêmicos (Radostits et al., 2006). A infecção pode ser diagnosticada por meio da cultura e identificação do patógeno a partir de uma amostra de leite coletada assepticamente. Os patógenos bacterianos mais comuns, em ordem decrescente de frequência, são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, outros estreptococos e coliformes (Fraser, 1996). Rotineiramente, os úberes são expostos às bactérias causadoras de mastite nos períodos de lactação, entre os intervalos de ordenha e também durante a ordenha (Nickerson, 1995). Por ser a mastite bovina uma doença de alto impacto econômico a prevenção, controle e tratamento desta doença são de fundamental importância para a pecuária leiteira. O tratamento da mastite bovina é baseado, quase que exclusivamente, no uso de produtos antimicrobianos convencionais comumente comercializados. O manejo terapêutico da doença pode basear-se na administração de formulações de liberação imediata durante a lactação ou em formulações de ação prolongada durante o período seco. Normalmente, para casos de mastite clínica são utilizados antimicrobianos e anti-inflamatórios sistêmicos combinados ou não a antimicrobianos intramamários. Já para casos de mastite subclínica é preconizado o uso de antimicrobianos intramamários durante o período seco do animal (Figura 3).

**Figura 3.** Tratamento antimicrobiano intramamário preconizado em casos de mastite subclínica durante o período seco (improdutivo). As bolinhas pretas representam os microrganismos, as vermelhas representam os ativos antimicrobianos e a coloração amarela representa o veículo dos ativos antimicrobianos.



Nesse contexto, o tratamento mais utilizado para a mastite subclínica é a terapia da vaca seca (TVS), que consiste em, após a secagem do animal, no intervalo entre lactações, logo após a última ordenha, introduzir na glândula mamária produtos antimicrobianos específicos. Quando a mama está seca (improdutiva), os tecidos secretores regridem e o tecido conjuntivo se constitui numa maior porcentagem da glândula. Na regressão do parênquima glandular pós-lactação, o leite residual é reabsorvido, ocorre uma redução do número de alvéolos, mas permanece o sistema galactóforo e lóbulos de tecido adiposo. Entretanto, ainda permanecem algumas estruturas secretoras incapazes de exercer sua função, retomando a atividade na próxima lactação (Feitosa, 2004).

A TVS é considerada um dos melhores métodos de controle da mastite devido às melhores taxas de cura (Nickerson, 1995). Entretanto, nota-se que no Brasil, apesar de existirem programas oficiais que restringem e/ou proíbem o uso de antimicrobianos para animais de produção, normas para o uso terapêutico ainda estão em fase de desenvolvimento (Rabello et al., 2020). Este fato pode colaborar para o incremento da resistência aos antimicrobianos e para a ocorrência de resíduos destes no leite e derivados devido ao mau uso (Vieira et al., 2012; Haubert et al., 2017). A utilização indiscriminada de agentes antimicrobianos convencionais para tratamento de mastites constitui um grave problema no tratamento de mastite em bovinos leiteiros. Além disso, é importante ressaltar que esses fatores também representam um grave problema de saúde pública. Em um estudo com

amostras de leite comercializadas no estado do Paraná, por exemplo, foi possível verificar que 19% destas estavam contaminadas por resíduos dos antibióticos cloranfenicol, tetraciclina, gentamicina, estreptomicina e  $\beta$ -lactâmicos (Vieira et al., 2012). A presença de cepas de *S. aureus* multirresistentes em alimentos de origem animal também tem sido relatada (Basanisi et al., 2016). Tais fatores alertam para a gravidade do problema que representa um perigo potencial para a saúde tanto da pecuária quanto da população (Basanisi et al., 2016).

Neste contexto, a pressão da população levanta discussões críticas para a produção de um alimento livre de contaminantes e de qualidade biológica superior. Destaca-se, por exemplo, o aumento da procura por produtos orgânicos e agroecológicos, incluindo leite orgânico. De acordo com a IN nº 46, de 2011, o leite orgânico deve ser produzido segundo rigorosos parâmetros que envolvem a alimentação, o manejo, as instalações, a genética, o processamento e a venda. Quanto ao manejo sanitário, a legislação preconiza medidas preventivas baseadas no uso de produtos homeopáticos e fitoterápicos, restringindo o uso de antimicrobianos convencionais somente em casos de sofrimento ou risco de morte do animal (Brasil, 2011). Portanto, a mastite representa para esse sistema um importante entrave, pois não existe um tratamento antimicrobiano apropriado. Conforme a IN nº46 Art. 63 cada animal só poderá ser tratado com medicamentos não permitidos para uso na produção orgânica por, no máximo, duas vezes no período de um ano. Se houver necessidade de se efetuar um número maior de tratamentos o animal deverá ser retirado do sistema orgânico (Brasil, 2011).

Na mesma linha de regularização da produção orgânica, a IN nº 17, de 2014, também prevê que a produção animal orgânica deve manter a higiene e a saúde em todo o processo criatório, obedecendo à legislação sanitária vigente para a produção de leite e adotando o uso de produtos e medicamentos permitidos na prevenção e tratamento de enfermidades dos animais orgânicos como, por exemplo, os fitoterápicos (Brasil, 2014). Assim, a TVS torna-se prática inviável nesses sistemas de produção, tendo em vista que não existe no mercado brasileiro um produto antimicrobiano disponível para este fim que seja permitido pela legislação. Destaca-se que a mastite já foi relatada como sendo o principal problema sanitário enfrentado por produtores agroecológicos do sul do Brasil, também relacionada a altas perdas econômicas e produtivas (Hidalgo et al., 2007).

## ***Mastite Bovina Subclínica por Staphylococcus aureus***

*S. aureus* são importantes bactérias envolvidas em processos de infecções subclínicas que elevam o número de células somáticas no leite, tanto em nível individual como em nível de rebanho (Thimothy, 2000). *S. aureus* são bactérias formadoras de colônias e sua nomenclatura se dá pela coloração da colônia, na maioria das vezes, amarelo ouro. Produz grande quantidade de proteínas extracelulares, importantes para a colonização e crescimento dos estáfilos em vários tecidos, associadas às células do hospedeiro (Quinn et al., 2005). *S. aureus* produzem infecções de difícil tratamento, o que requer o emprego de estratégias de controle, tais como a desinfecção intramamária (Thimothy, 2000). Animais que apresentam mastite subclínica por *S. aureus* constituem-se em permanentes fontes de risco de infecção para outros animais e podem potencializar a prevalência das infecções dentro dos rebanhos.

O tratamento da mastite subclínica durante a lactação é considerado inviável devido aos custos elevados com diagnóstico e medicamentos, a necessidade de descarte do leite e a baixa taxa de cura bacteriológica (Radostitis et al., 2006). Os tratamentos realizados durante a lactação são, na maioria dos casos, ineficazes para casos de mastites causadas por *S. aureus*, tornando-se praticamente incuráveis (Radostits et al, 2007; Blowey & Edmondson 1999). O insucesso dos tratamentos de casos subclínicos durante a lactação tem apresentado relação com a presença do leite capaz de reduzir a eficácia dos antimicrobianos e principalmente com o fato das bactérias *S. aureus* conseguirem sobreviver dentro das células e a maioria dos antibióticos serem incapazes de penetrá-las (Blowey & Edmondson 1999).

*S. aureus* pode resistir aos mecanismos imunológicos de defesa (Quinn et al., 2005; Blowey & Edmondson, 1999) e possui a capacidade de conversão de fibrinogênio em fibrina, resultando no isolamento do local da infecção da resposta imune efetiva através da produção de coagulase (Quinn et al. 2005). Hébert et al. (2000), destacaram que as bactérias *S. aureus* são capazes de penetrar, sobreviver e multiplicar-se nas células alveolares e nos macrófagos, sem, entretanto, manter necessariamente uma infecção ativa, ou seja, ficam latentes para causarem uma infecção ativa posteriormente.

Estes microrganismos têm ainda sua importância associada a outros fatores de virulência, como a resistência a múltiplos princípios ativos de fármacos e a capacidade de formação de biofilmes, para algumas linhagens. A formação de biofilmes pode ser considerada uma estratégia básica de sobrevivência de algumas bactérias e está associada a

casos de infecções recorrentes. Dentro dos biofilmes as bactérias estão protegidas de produtos antibacterianos, bacteriófagos ambientais e amebas fagocíticas (Donlan et al., 2002). Como mostrado na Figura 4, *S. aureus* tem a habilidade de criar biofilme em quatro estágios e atua como um recurso de virulência imperativa associado a várias síndromes, a exemplo da mastite (Algharib et al., 2020). Esta habilidade pode conferir resistência antimicrobiana persistente, atrasar a fagocitose e reduzir ou incentivar a inflamação, de acordo com o padrão da doença (Algharib et al., 2020).

**Figura 4.** Estratégias no desenvolvimento e gerenciamento dos biofilmes. Fonte: Adaptado de Joo & Otto, 2012.



Destaca-se ainda que *S. aureus* pode produzir toxinas que destroem as membranas celulares, danificam diretamente o tecido produtor de leite e é ainda capaz de induzir a necrose de células da glândula mamária bovina (Zhao et al., 2008). As toxinas citolíticas produzidas por *S. aureus* também estão sendo consideradas vitais no estabelecimento de biofilmes (Algharib et al., 2020). A toxina alfa é muito importante nas comunicações celulares, enquanto a toxina beta forma uma matriz nucleoproteica insolúvel na presença de ácido desoxirribonucleico (DNA) por meio de ligações cruzadas covalentes. Além disso, as células epiteliais que revestem as tetas e cisternas das glândulas do quarto podem ser destruídas pelas toxinas alfa e beta, conseqüentemente, causando danos diretos ao tecido produtor de leite, criando cavidades profundas de infecção nos alvéolos e presença de tecido cicatricial nos casos de mastite clínica (Algharib et al., 2020).

Com base no exposto, os tratamentos realizados durante a lactação permanecem em sua maioria sendo considerados ineficientes para casos de mastites causadas por *S. aureus*. Por outro lado, uma taxa de cura maior para infecções estafilocócicas é obtida na realização de terapia de vaca seca com infusão antimicrobiana apropriada de longa duração (Fraser, 1996). As infecções estafilocócicas são as que melhor respondem a TVS, pois o uso intramamário de antimicrobianos formulados em veículos de liberação e absorção prolongadas é capaz de conferir maior tempo de persistência do antimicrobiano dentro da glândula mamária (Fraser, 1996; Cunningham e Klein, 2008). As terapias medicamentosas durante o período seco podem alcançar em torno de 75% de eliminação de *S. aureus* (Quinn et al., 2005).

Outra grande preocupação em relação a *S. aureus* deve-se ao aparecimento de cepas multirresistentes. Estas são bactérias patogênicas resistentes a múltiplos princípios ativos, que ameaçam seriamente a saúde humana e animal. Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) de Atlanta, nos Estados Unidos, microrganismos resistentes são aqueles que apresentam resistência a uma ou mais classes de antimicrobianos (CDC, 2020). Não há consenso no meio científico na definição de multiresistência bacteriana, porém, é bastante aceito que, quando se faz somente teste de suscetibilidade fenotípica, a multiresistência é caracterizada pela resistência a três ou mais classes de agentes antimicrobianos (Schwartz, 2010).

Os primeiros registros de surtos por *S. aureus* resistentes à penicilina foram encontrados em meados dos anos de 1950 e 1960 quando surgiu o primeiro caso de resistência às penicilinas beta lactâmicas, como a meticilina (Oliveira & Silva, 2008). No final da década de 1970, as cepas *S. aureus* resistentes à meticilina (SARM) foram reconhecidas como uma pandemia cujo controle permanece distante até os dias atuais (Oliveira & Silva, 2008). Embora o termo resistência à meticilina inclua resistência à derivados de  $\beta$ -lactâmicos, as cepas de SARM geralmente apresentam resistência múltipla a vários grupos de antibióticos (Camarena & Sánchez, 1998). Através de vários mecanismos, esses isolados mostraram resistência ao cloranfenicol, tetraciclina, macrólidos, lincosaminas, aminoglicosídeos e até quinolonas (Camarena & Sánchez, 1998).

Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou uma lista de “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antibióticos, um catálogo de 12 famílias de bactérias que representam a maior ameaça para a saúde humana (OMS, 2017). A lista foi elaborada numa tentativa de orientar e promover o desenvolvimento de novos

antimicrobianos para enfrentar a crescente resistência global aos medicamentos antimicrobianos (OMS, 2017). A lista destaca a ameaça de bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos, como *S. aureus* resistente à meticilina, com sensibilidade intermediária e resistência à vancomicina. Essas bactérias têm capacidades inatas de encontrar novas formas de resistir ao tratamento e podem transmitir material genético que permite a outras bactérias se tornarem também resistentes aos fármacos (OMS, 2017).

Em relação ao mecanismo de resistência de SARM, Camarena & Sánchez (1998) atribuem uma associação à síntese de novas proteínas com baixa afinidade para a meticilina e o restante dos  $\beta$ -lactâmicos, sendo o determinante genético dessa proteína de natureza cromossômica (gene *mec*). As estirpes de SARM com resistência à meticilina possuiriam os marcadores genéticos *mecA* e *PBP2a* (Camarena & Sánchez, 1998). Outras modalidades de resistência também foram descritas, como o chamado *borderline*, relacionado com a hiperprodução de  $\beta$ -lactamases e resistência modificada nas proteínas de ligação de penicilina (mod-SA) (Camarena & Sánchez, 1998).

A prevalência de *S. aureus* resistentes a diversos princípios ativos de fármacos é bastante variável na produção leiteira. Um estudo realizado no sul do Brasil mostrou elevada prevalência de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) em fazendas leiteiras, no qual, dos 31 isolados analisados 65% apresentou resistência a múltiplos princípios ativos de fármacos (Haubert et al., 2017). Semelhantemente, um estudo realizado em Pernambuco classificou 62% de 291 isolados de *S. aureus* como multirresistentes (Medeiros et al., 2009). Outra pesquisa realizada com 815 isolados de leite mastítico provenientes dos EUA e de nove países europeus mostrou que todos os isolados analisados foram resistentes a penicilina e uma menor parte a estreptomicina e a tetraciclina (Vintov et al., 2003). Em outro estudo realizado na China, todos os isolados de *S. aureus* avaliados apresentaram resistência a vários princípios ativos de fármacos antimicrobianos, tais como ao sulfametoxazol (100%), penicilina G (94,3%), ampicilina (94,3%), eritromicina (68,6%), azitromicina (68,6%), clindamicina (25,7%), amoxicilina (11,4%) e tetraciclina (5,7%) (Wang et al., 2016). No Brasil, observou-se que a penicilina, a ampicilina, a amoxicilina e a neomicina são os antimicrobianos para os quais os microrganismos causadores de mastite em ruminantes apresentam maior resistência (Acosta et al., 2016).

Outra questão que também tem sido motivo de grande preocupação está relacionada à transmissão de SARM entre animais de um rebanho e destes para os trabalhadores rurais em contato com o rebanho (Soavi et al., 2010; Locatelli et al., 2017). SARM foi encontrado em amostras nasais de funcionários de propriedades rurais, de vacas e de bezerros; foram

também detectados em amostras de leite em tanques a granel e amostras ambientais de instalações de suínos (Spohr et al., 2009). A transmissão de SARM para humanos também foi relatada na Hungria e na Espanha, causando complicações e preocupações em relação a doenças de pele, endocardite, pneumonia e fascíte necrotizante (Soavi et al., 2010; Lozano et al., 2011). A prevalência de SARM no nível de rebanho leiteiro tem alta variação, de 1 a 60% (Spohr et al., 2009; Locatelli et al., 2017), mas podem ser considerados novos e rapidamente emergentes reservatórios de SARM.

De acordo com o exposto e ainda visando à produção de leite “limpo”, saudável, de qualidade biológica superior, livre de contaminantes fica evidente a urgente necessidade do desenvolvimento de novas estratégias mais eficazes de controle desses patógenos para o tratamento da mastite bovina, capazes de superar os problemas expostos e contemplar tanto a produção de leite convencional como a produção de leite orgânico/agroecológico. Destaca-se, neste contexto, o potencial do emprego das plantas medicinais com reconhecida ação antimicrobiana associadas à nanotecnologia para o controle da doença.

### ***Plantas Mediciniais***

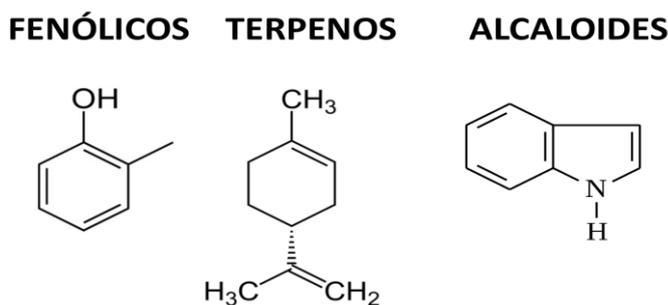
A utilização de plantas medicinais na saúde humana e na saúde animal como agentes terapêuticos de tratamento, cura e prevenção de doenças datam milhares de anos e tem acompanhado a evolução das espécies ao longo do tempo (Fowler, 2006). Planta medicinal é definida como sendo "todo e qualquer vegetal que possui substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos" (WHO, 1998). As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de medicamentos, podendo ser usadas diretamente como agentes terapêuticos e também como materiais de partida para a síntese de medicamentos ou como modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 1998; Veiga Junior et al., 2005). Dentre os potenciais biológicos atribuídos às plantas medicinais, destaca-se a atividade antimicrobiana. Uma análise de dados da literatura disponível de 1981 a 2006 mostrou que mais de 50% dos medicamentos aprovados pelo FDA eram produtos naturais ou derivados de produtos naturais, os quais se mostraram a principal fonte de descoberta de medicamentos antimicrobianos (Mushtaq et al., 2018).

As propriedades biológicas atribuídas às plantas medicinais têm relação direta com a síntese de compostos químicos chamados de metabólitos secundários. A síntese de

metabólitos secundários pelas plantas tem sido considerada uma forma de defesa contra os mais variados fatores externos, incluindo radiação UV, competição, predação, as quais são importantes para a sobrevivência de uma determinada espécie no seu ambiente (Taiz & Zeiger, 2004; Harborne, 2007). Neste sentido, os metabólitos secundários desempenham um papel importante na adaptação das plantas ao seu ambiente, sendo capazes de contribuir amplamente para a sua aptidão através da interação com os ecossistemas (Bourgau et al., 2001). É importante destacar que a produção destes compostos sofre influência do ambiente no qual se desenvolvem, podendo apresentar diferenças quali e quantitativas em função da época de cultivo, clima, condições de fertilidade e adubação, entre outras (Bennett & Wallsgrove, 1994).

Os compostos secundários das plantas são, geralmente, classificados de acordo com suas vias biossintéticas, nas quais três grandes famílias de moléculas são consideradas: fenólicos, terpenos e alcalóides (Harborne, 1999; Figura 5).

**Figura 5.** Estrutura química dos fenólicos, terpenos, alcalóides.



Dentre essas classes, destacam-se os fenólicos, família a qual esta tese se restringe. Os fenólicos estão envolvidos na síntese de lignina sendo comuns a todas as plantas superiores, podendo ser encontrados em praticamente todas as partes das plantas desempenhando importantes funções (Harborne, 1999; Bourgau et al., 2001). Os compostos fenólicos são estruturas aromáticas que possuem um ou mais grupos hidroxila, sendo a maioria polifenóis (Harborne, 1999). Neste grupo, os compostos podem ser classificados em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Estes compostos são capazes de desempenhar importantes atividades biológicas em humanos e animais, i.e., antimicrobiana, anti-inflamatória, antifúngica, antioxidante, antitumoral, que despertam o interesse no desenvolvimento de novos fármacos (Retta et al., 2012; Duarte, 2006).

Nesse contexto, a complexidade das plantas em termos fitoquímicos pode representar uma vantagem sobre os diversos efeitos biológicos esperados. Os diferentes mecanismos de ação dos fenólicos podem apresentar atividade antimicrobiana direta, aumentar a atividade de antimicrobianos específicos ou ainda reverter a resistência de alguns tipos bacterianos a determinados princípios ativos (Matias, 2010; Alencar et al., 2015). O aumento da atividade antimicrobiana ou a reversão da resistência podem classificá-los como “agentes modificadores da ação antimicrobiana”, característica que pode ser de extrema importância no controle de bactérias resistentes (Matias, 2010; Mushtaq et al., 2018). É importante destacar que a resistência contra agentes antimicrobianos à base de plantas também pode ser desenvolvida, tal como acontece com os fármacos sintéticos, embora evidências científicas mostrem ser bastante difícil (Santana et al., 2012). Evolutivamente as plantas podem ter desenvolvido alguma estratégia química diferente para o controle de infecções microbianas, a fim de diminuir a pressão seletiva para o desenvolvimento de resistência, como o sinergismo (Mushtaq et al., 2018).

O termo sinergia provém da palavra grega “synergos”, que significa trabalhar em conjunto (Eid et al., 2012; Casanova & Costa, 2017). Ou seja, as interações sinérgicas podem ser observadas quando o efeito produzido por uma combinação de substâncias é superior ao que se esperaria da contribuição de seus componentes individualmente (Eid et al., 2012; Casanova & Costa, 2017). O sinergismo pode aumentar a biodisponibilidade de substâncias ativas e/ou reduzir as doses destas, contribuindo para a diminuição da toxicidade e efeitos adversos, podendo assim aumentar a eficácia terapêutica de produtos naturais (Casanova & Costa, 2017). A sinergia pode resultar de dois mecanismos principais: (a) efeitos farmacocinéticos, observados quando uma substância influencia a solubilidade, absorção ou metabolismo de outra, e (b) efeitos farmacodinâmicos, relacionados à atuação simultânea sobre diferentes alvos terapêuticos inter-relacionados (Casanova & Costa, 2017). Nesse contexto, o sinergismo entre os compostos químicos antimicrobianos pode resultar em diferentes mecanismos de ação sobre os patógenos causadores de doenças, podendo-se ter maior eficácia e menor risco de resistência microbiana que os medicamentos convencionais (Mushtaq et al., 2018). Um exemplo clássico de sinergismo envolvendo um notável produto natural, a própolis, com a mastite bovina pode ser encontrado no estudo de Santana et al. (2012). Neste estudo, após 60 gerações de cultivo, não foi encontrada resistência a concentrações sub-letais de própolis frente a *S. aureus*. Tais resultados foram atribuídos ao

fato da própolis ser uma matriz complexa, a qual contém muitos constituintes químicos com distintos mecanismos de ação (Santana et al., 2012).

Das plantas medicinais, alguns pontos ainda merecem destaque, principalmente por estarem relacionados com a limitação do seu uso, são eles: toxicidade, solubilidade e degradação. Nesse contexto, ressalta-se a importância da avaliação de possíveis efeitos tóxicos para garantir eficácia e segurança de uso (Veiga Junior et al., 2005; Fiordalisi et al., 2018b); e a importância de associar as plantas medicinais à nanotecnologia. Através desta ciência é possível desenvolver nanoestruturas que protegem os metabólitos secundários da rápida degradação quando expostos a agentes oxidantes como a luz, o oxigênio e a temperatura, assim como pode eliminar o uso de solventes orgânicos como etanol, metanol, etc., pelo desenvolvimento de formulações em água. Tais características ampliam as possibilidades de aplicação dos produtos naturais, pois permitem superar algumas limitações do seu uso (Harwansh et al., 2019).

Diante do exposto, as plantas medicinais se reafirmam como potenciais agentes terapêuticos de fácil obtenção e forte tradição, podendo ser amplamente utilizadas na medicina humana e também com potencial de contribuição para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas na medicina veterinária. O desenvolvimento de antimicrobianos nanoestruturados a base de plantas medicinais visando à terapêutica da mastite bovina pode ser uma alternativa sustentável, desde que tenha sua eficácia e segurança de uso comprovadas.

### ***Plantas Medicinais no Tratamento da Mastite Bovina***

A etnoveterinária estuda as práticas populares de utilização das plantas medicinais no tratamento ou prevenção das doenças que acometem os animais. Pesquisas de práticas etnoveterinárias são crescentes e prevalentes em locais onde o uso da medicina humana natural é comum. Algumas evidências do uso da fitoterapia no tratamento da mastite em diferentes partes do mundo estão relatadas na revisão de literatura de Mushtaq et al. (2018), evidenciando que a mastite e a forma como essa doença vem sendo tratada precisa mudar, pois representa uma preocupação mundial em termos de saúde pública. Nesse contexto, métodos alternativos de tratamento e cura da mastite bovina estão sendo usados empiricamente, principalmente por produtores de leite orgânicos em diferentes partes do mundo. Entretanto, dados científicos para apoiar o uso desses tratamentos alternativos ainda

são escassos. Nos Estados Unidos, por exemplo, os agricultores orgânicos têm tratado a mastite clínica usando uma variedade de terapias alternativas, incluindo produtos à base de soro de leite, vegetais, suplementos vitamínicos e homeopatia (Mushtaq et al., 2018). Na Índia, várias espécies de plantas como *Spathodea campanulata* e *Tridax procumbens* têm sido usadas para curar a mastite (Mushtaq et al., 2018). Na Colúmbia Britânica, Canadá, a mastite tem sido tratada com *Achillea millefolium*, *Arctium lappa*, *Salix alba*, *Teucrium scorodonia* e *Galium aparine* (Mushtaq et al., 2018). No Paquistão, em um estudo participativo sobre práticas etnoveterinárias, por exemplo, foram documentadas 25 espécies de plantas distintas para o tratamento e profilaxia de mastite bovina e bubalina (Dilshad et al., 2010). Os estudos citados acima destacam algumas alternativas de tratamento da mastite baseada no uso popular de produtos naturais, entretanto negligenciam a importância da investigação do conhecimento popular aliado ao conhecimento científico para que essas práticas sejam realizadas com segurança.

Nesse sentido, alguns avanços no contexto da terapêutica da mastite bovina destacam estudos do uso de plantas medicinais com eficácia científica comprovada. Mubarack et al. (2011), por exemplo, conduziram um estudo com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana de extratos aquosos e alcoólicos da parte aérea de *Brachiaria* sp., *Cenchrus ciliaries*, *Abutilon indicum* e *Coccinia grandis* contra patógenos causadores de mastite bovina. Os resultados revelaram que os extratos das quatro plantas testadas possuíam atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Str. agalactiae*, e *Klebsiella pneumoniae*. No Brasil, Diaz et al. (2010) encontraram resultados positivos com os extratos de Pau-fava, Losna, Citronela e Alecrim-do-campo que validaram o uso popular dessas plantas no tratamento da mastite. Neste estudo, o extrato de citronela foi o que apresentou maior atividade contra *S. aureus* com concentração inibitória mínima de 0,5 mg/mL. Da mesma forma, Kalayou et al. (2012), testaram a atividade antimicrobiana de nove plantas etnoveterinárias para tratar mastite, feridas e complicações gastrointestinais. Entre as plantas medicinais testadas, as espécies *Calpurinia aurea*, *Croton macrostachyus*, *Achyranthes aspera*, *Nicotiana tabacum* e *Vernonia species (Alakit)* apresentaram atividade antimicrobiana mais promissora. Os autores ressaltaram, entretanto, a necessidade de estudos adicionais sobre a toxicidade e as características fitoquímicas das espécies estudadas. O potencial do suco das folhas de manjeriço foi também avaliado no tratamento da mastite crônica causada por *S. aureus* em cabras (Dash et al., 2016). Os testes realizados revelaram o potencial do tratamento utilizado como terapia de suporte. Estudos de Mushtaq

et al. (2016) também evidenciaram que as atividades antimicrobianas do extrato e de compostos isolados de *Thalictrum minus* sustentaram o seu uso tradicional no tratamento da mastite bovina. Da mesma forma, Das et al. (2009), avaliaram *in vitro* a atividade antibacteriana do extrato aquoso e metanólico de erva-de-touro e de bisnagueira contra patógenos isolados de leite mastítico. O extrato metanólico de ambas as plantas mostrou atividade significativa contra *S. aureus* coagulase positivo e *Str. agalactiae*. Nessa mesma linha de pesquisa, resultados promissores foram encontrados por Fiordalisi et al. (2016) ao avaliarem o extrato de própolis oriunda de Urupema-SC. Este além de exercer uma importante atividade antimicrobiana contra *S. aureus* isolados de leite mastítico mostrou baixa toxicidade às células de explantes da glândula mamária bovina. Ainda buscando evidências científicas do uso de produtos naturais na terapêutica da mastite, a tabela 1 reuniu uma seleção de trabalhos exitosos realizados com o objetivo de desenvolver novas alternativas com elevado potencial antimicrobiano para o tratamento da doença. A seleção dos trabalhos foi realizada com base nos objetivos e resultados promissores das pesquisas realizadas a partir de 2001, usando como referência a base de dados do Google Acadêmico, na qual incluiu os termos mastite bovina, produtos naturais, atividade antimicrobiana e potencial antimicrobiano.

**Tabela 1.** Trabalhos exitosos que mostraram o elevado potencial antimicrobiano de produtos naturais para o tratamento da mastite bovina.

Ativo natural	Bactéria	Referência	Ativo natural	Bactéria	Referência
<i>Senna macranthera</i> <i>Artemisia absinthium</i> <i>Cymbopogon nardus</i> <i>Baccharis dracunculifolia</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Diaz et al., 2010	<i>Alternanthera brasiliana</i> <i>Achillea millefolium</i> <i>Baccharis trimera</i> <i>Solidago chilensis</i> <i>Symphitum officinale</i> <i>Sambucus nigra</i> <i>Mentha sp.</i> <i>Ocimum basilicum</i> <i>Parapiptadenia rigida</i> <i>Cuphea carthagenensis</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Avancini et al., 2008
Extrato etanólico de própolis	<i>Staphylococcus sp.</i>	Pinto et al., 2001	<i>Tabernaemontana divaricata L.</i> <i>Combretum molle</i> <i>Commicarpus pedunculatus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Gopinath et al., 2011 Tadele et al., 2009
Extrato metanólico de própolis	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Gonsales et al., 2006	<i>Eugenol</i> Carvacrol Timol	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>	Baskaran et al., 2009
Extrato etanólico de própolis	<i>Staphylococcus aureus</i>	Silva et al., 2012	<i>Cedrus deodara</i> <i>Caruma longa</i> <i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Streptococcus uberis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>	Hase et al., 2013
<i>Calpurinia áurea</i> <i>Croton macrostachyus</i> <i>Achyranthes aspera</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Vernonia species (Alakit)</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Dermatophilus congolensis</i>	Kalayou et al., 2012	<i>Morinda citrifolia fruit juice</i>	<i>Contagem bacteriana total</i>	Sunder et al., 2013
<i>Thalictrum minus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus xylosum</i> <i>Staphylococcus equorum</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Pantoea sp.</i>	Mushtaq et al., 2016	<i>Ocimum sanctum (Tulsi)</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Corynebacterium</i>	Shafi et al., 2016
<i>Cymbopogon citrates</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Escherichia coli</i>	Aiemsaaed et al., 2011	<i>Adiantum capillus</i> <i>Nepata cataria</i> <i>Funaria indica</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Reshi et al., 2017
<i>Satureja montana L.</i> <i>Thymus vulgaris L.</i> <i>Origanum vulgare L.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus chromogenes</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> <i>Staphylococcus warneri</i> <i>Staphylococcus xylosum</i> <i>Escherichia coli</i>	Fratini et al., 2014	<i>Curcuma longa</i> <i>Areca catechu</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Garcinia mangostana</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>	Chusri et al., 2016
<i>Mimhostachys verticillata</i> <i>Limono</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	Montironi et al., 2016	<i>Withania somnifera</i> <i>Asparagus racemosus</i> <i>Emblica officinalis</i> <i>Ocimum sanctum</i> <i>Tinospora cordifolia</i> <i>Tribulus terrestris</i> <i>Nigella sativa</i>	<i>Contagem de células somáticas</i>	Sharma et al., 2013
<i>Rhodomyrtus tomentosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Mordmuang et al., 2015	<i>Shimney oak</i> <i>Post oak</i> <i>Locust</i> <i>Blackjack oak</i> <i>Stank bush</i> <i>Sericea lespedeza</i> <i>Quebracho</i> <i>Sumac</i> <i>Plum</i>		Min et al., 2008
<i>Hibiscus sabdariffa L.</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i>	Nath et al., 2015			
<i>Aquilegia fragrans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Echerichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus xylosum</i> <i>Staphylococcus equorum</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Pantoea sp.</i>	Mushtaq et al., 2016			
<i>Achyrocline satereioides</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Fiordalisi et al., 2018			
Extrato etanólico de própolis	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pinheiro Machado et al., 2019			
Nanopartículas de própolis	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pinheiro Machado et al., 2019			
<i>Anacardium occidentale Linn.</i> <i>Baccharis trimera</i> <i>Bidens pilosa</i> <i>Eucalyptus sp.</i> <i>Polygonum hydropiper</i> <i>Tagetes minuta</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pereira et al., 2015 Schuch, 2007			
<i>Baccharis dracunculifolia</i> <i>Croton antisiphiliticus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Nader, 2010			
<i>Copaifera sp.</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>	Rodrigues et al., 2013			
<i>Linum usitatissimum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Candida albicans</i>	Kaithwas et al., 2011			

Diante do exposto, considera-se promissora a utilização de produtos naturais, principalmente na forma nanoestruturada, na terapêutica da mastite bovina, na qual busca-se agentes eficazes contra a doença, com alto potencial antimicrobiano, baixa toxicidade para células epiteliais, menores chances de desenvolvimento de resistência e que não comprometam a qualidade do leite. Nesse contexto, o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas para a mastite através da combinação de produtos naturais com novas tecnologias pode trazer ainda mais vantagens do uso destes materiais, além de poder representar uma alternativa de substituição de antimicrobianos convencionais, desde que tenham sua eficácia comprovada. Destaca-se a macela, planta tradicionalmente utilizada na América do Sul, que representa uma candidata em potencial para o tratamento da mastite bovina, por possuir um amplo espectro de propriedades farmacológicas, com destaque para a capacidade citoprotetora e antimicrobiana (Rivera et al, 2004; Arredondo et al., 2004; Joray et al., 2013).

### **Macela**

A macela (*Achyrocline satureioides*) também conhecida como Marcela, Marcela-do-campo ou Marcela-da-terra (Neto et al., 2020) é uma planta herbácea de aproximadamente 1 m de altura, caule, ramos e folhas cobertos por pelos esbranquiçados, folhas lineares com largura de até 1,5 cm e 10 a 15 cm de comprimento e flores reunidas em inflorescência do tipo capítulo, de coloração amarela-clara (Lorenzi, 2000). É uma planta arbustiva da família Asteraceae, perene, aromática, que floresce em meados de março, nativa da América do Sul. É considerada uma planta invasora comumente encontrada em terrenos baldios, pastos e campos.

*A. satureioides* é amplamente utilizada como erva medicinal em sua região de origem (Sabini et al., 2013). As inflorescências secas da macela possuem aroma suave e agradável e correspondem as partes da planta utilizadas na medicina natural (Lorenzi, 2000). O uso mais comum é através da infusão ou decocção na forma de chás. Seu uso na forma de extrato hidroalcoólico também tem sido investigado (Fiordalisi, 2018a; Neto et al., 2020). A macela apresenta propriedades medicinais relacionadas principalmente a distúrbios gastrointestinais e inflamatórios (Simões et al., 1988), mas também atua como antiespasmódico, agente hipoglicêmico, como analgésico, anti-constipação e sedativo (Neto et al., 2020). A Figura 6 mostra uma amostra de *A. satureioides* produzida no Rio grande do Sul utilizada no presente estudo.

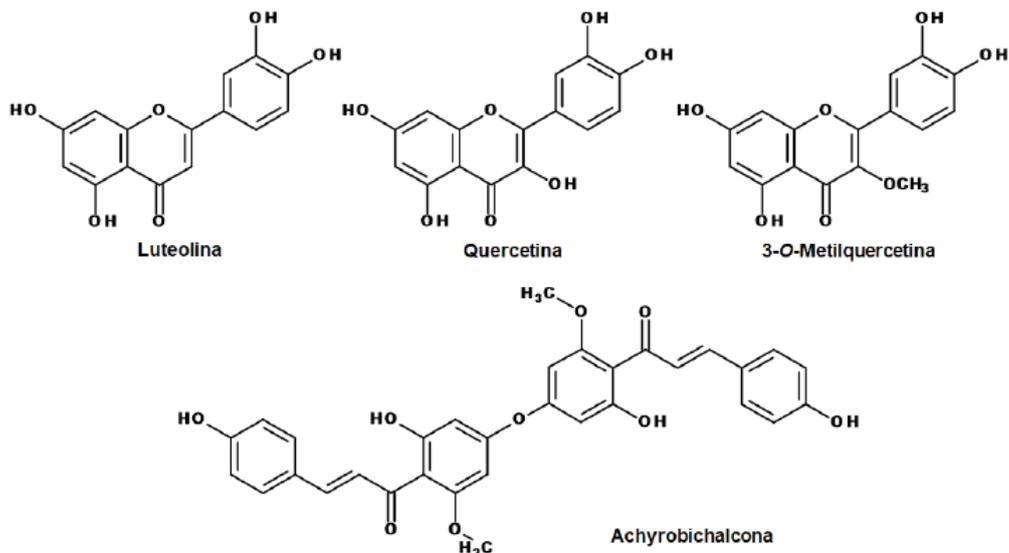
**Figura 6.** Amostra de macela utilizada no presente estudo oriunda de produtores orgânicos do Rio Grande do Sul.



*A. satureioides* está incluída na 'Lista de produtos fitoterápicos tradicionais de registro simplificado' do Ministério da Saúde do Brasil e já está incluída no Sistema Público de Saúde (SUS) (Neto et al., 2020). Recomenda-se que o consumo das infusões não exceda 1,5 g (1/2 colher de sopa) em 150 mL (xícara de chá) duas a quatro vezes ao dia (Neto et al., 2020). Um teste realizado em cultura de células (1 µg/mL de matéria seca de extrato etanólico) mostrou eficiência na indução da proliferação celular de queratinócitos (HaCaT) e fibroblastos (MRC-5) medidos pela contagem de células viáveis, essenciais para o processo de cicatrização de feridas após o tratamento, confirmando esta propriedade (Neto et al., 2020).

Em termos de composição química, o extrato de macela possui majoritariamente flavonoides, sendo os de maior ocorrência quercetina, 3-O metilquercetina, luteolina e achyrobichalcona (Retta et al., 2012; Bianchi, 2018; Figura 7). Além desses, são também encontrados ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido isoclorogênico, glicolipídios, sesquiterpenos, monoterpenos e polissacarídeos imunoestimulantes (Neto et al., 2020).

**Figura 7.** Estrutura química dos principais flavonoides presentes em inflorescências de *Achyrocline satureioides*. Fonte: Bianchi, 2018.



Dentre o amplo espectro de propriedades farmacológicas, medicinais e terapêuticas da macela (Rivera et al., 2004), destaca-se a sua baixa citotoxicidade (Arredondo et al., 2004; Sabini et al., 2013). O seu extrato aquoso, por exemplo, obtido por infusão, não demonstrou nenhum efeito toxicológico prejudicial *in vivo* em um estudo realizado com ratos, tendo sido seguro nas doses de 30-300 mg/kg, administrado intraperitonealmente e oralmente (Rivera et al., 2004). Em células humanas, Sabini et al. (2013), demonstraram que as concentrações popularmente administradas não possuem efeito citotóxico ou genotóxico, com valores de  $IC_{50}$  superiores a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Outra característica importante desta espécie é o efeito imunomodulador das infusões, além dos efeitos anti-inflamatórios. Consentino et al. (2008), destacaram que a infusão de macela afeta profundamente alguns parâmetros funcionais básicos da resposta imune tanto adquirida como inata em seres humanos. Além das atividades mencionadas, a investigação do potencial antimicrobiano de compostos isolados da macela foi realizada por Joray et al. (2013) que evidenciaram uma clara interação sinérgica entre os componentes presentes no extrato etanólico desta planta. Vargas et al. (2013), evidenciaram o potencial antioxidante e antimicrobiano da macela contra *E. coli*. Entretanto, os autores ressaltaram a importância das técnicas de extração e separação utilizadas para a obtenção do extrato e seus consequentes efeitos biológicos. De fato, de maneira geral, os produtos naturais demonstram ter interdependência entre suas características e as metodologias utilizadas no seu processamento. Mota et al. (2011), ao avaliarem também a atividade antimicrobiana da macela, destacaram que dentre as formas de extração, a hidroalcolatura apresentou capacidade de inibição e/ou inativação intensa e seletiva frente aos inóculos bacterianos de *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *S. aureus*

(ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 11229) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 11076). Já os decoctos mostraram-se completamente ineficazes frente às bactérias gram-negativas, enquanto que contra as gram-positivas apresentaram somente inibição.

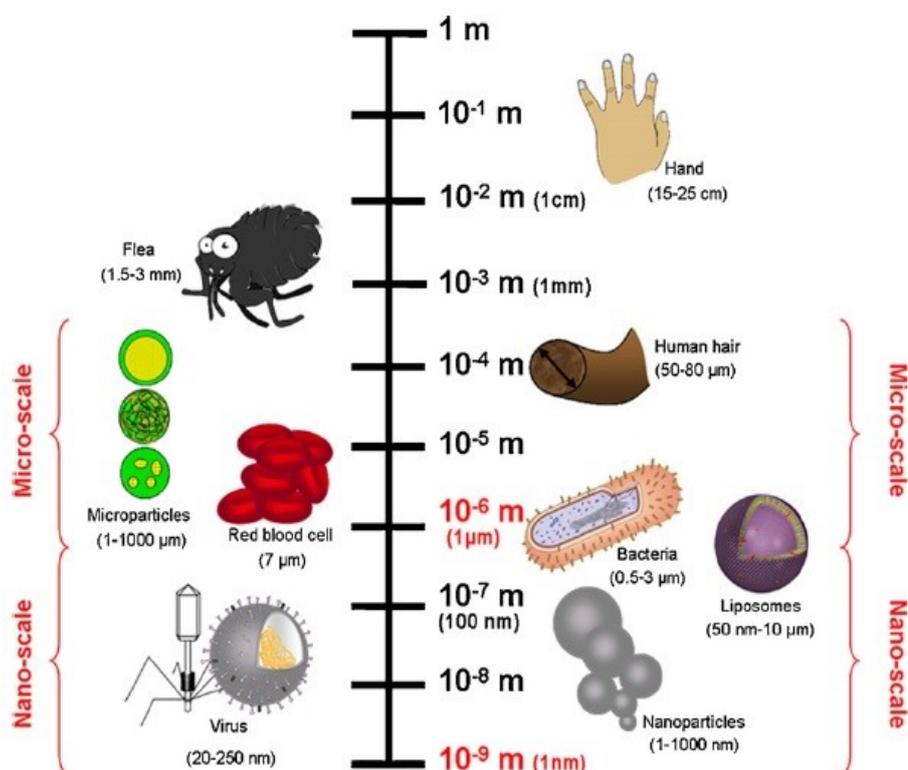
Apesar das reconhecidas propriedades biológicas atribuídas à macela, poucas pesquisas relacionam o seu uso no controle da mastite bovina. Avancini et al. (2016) avaliaram a ação antimicrobiana/desinfetante do extrato hidroalcoólico bruto das inflorescências de *A. satureioides* sobre uma cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC 14053) e isolados de casos de mastite bovina. Os resultados encontrados evidenciaram o seu potencial de uso sobre fontes de infecção, em procedimentos de desinfecção ou de antisepsia, ou em formulações que lhe sirvam de veículo. Além desse, destaca-se o estudo iniciado pelo grupo de pesquisa LABINAT (Fiordalisi, 2018a) que avaliou a atividade antimicrobiana e a citotoxicidade do extrato aquoso e hidroetanólico da macela visando o tratamento da mastite bovina. Neste estudo, encontrou-se uma concentração inibitória mínima (CIM) contra *S. aureus* isolados de leite mastítico de 250 µg/mL e uma concentração capaz de matar 50% das células epiteliais mamárias bovinas (IC50) de 541,7 µg/mL. Portanto, de maneira geral, tais estudos apontam a macela como um produto natural promissor a ser empregado no tratamento da doença.

Com o propósito de dar continuidade aos estudos da aplicação da macela na terapêutica da mastite bovina, buscou-se no presente estudo desenvolver formas farmacêuticas a base do extrato nanoemulsionado desta planta. O desenvolvimento das nanoemulsões contendo o extrato de macela foi proposto inicialmente para que se pudesse ter um produto estável, capaz de proteger os ativos metabólitos secundários das reações de degradação a que estão normalmente submetidos, com adequado tempo de armazenamento. Buscou-se ainda, através das nanoemulsões uma forma de aplicação mais específica capaz de garantir um maior potencial de permeação e liberação gradual dos ativos para uma possível aplicação intramamária. Algumas evidências sustentam que o uso de sistemas nanoestruturados pode revelar efeitos funcionais e biológicos mais efetivos para via de aplicação intramamária na terapêutica da mastite bovina (Algharib et al., 2020). O insucesso das terapias antimicrobianas comumente utilizadas na terapêutica da mastite causada principalmente por *S. aureus* também foi levado em consideração para o desenvolvimento dessas novas alternativas terapêuticas.

## Nanotecnologia na Produção Animal

A nanotecnologia consiste na aplicação de conhecimentos científicos para a manipulação da matéria em escala nanométrica (Hosokawa et al., 2007). Um nanômetro corresponde a unidade de comprimento equivalente à bilionésima parte de um metro, ou  $10^{-9}$  m (Figura 8).

**Figura 8.** Escala de tamanho de nanomateriais em comparação com vários componentes biológicos. Fonte: Irache et al. (2011).



A nanotecnologia permite criar, explorar e manipular materiais gerando novas propriedades químicas, físicas e biológicas (FDA, 2015). Além disso, as propriedades especiais dos nanomateriais podem proporcionar o aumento da estabilidade dos compostos ativos, o aumento do poder de penetração dos compostos de interesse em tecidos, bem como a diminuição da citotoxicidade (Dong et al., 2009; Brandão et al., 2011). Estas propriedades podem permitir o uso de menos material e reações químicas e físicas novas ou mais eficientes, em comparação com materiais de maior escala (Kuzma, 2010). As nanoestruturas podem melhorar o índice terapêutico dos fármacos através de três mecanismos-chave, a saber: i) permitem o uso de fármacos insolúveis ou instáveis; ii) aumentam a concentração

de fármaco no seu local de ação, resultando em aumento da eficácia; iii) reduzem a toxicidade sistêmica e a concentração de fármaco em tecidos saudáveis, devido à acumulação preferencial nos locais alvo (Underwood et al., 2012). Como consequência, as fórmulas nanoestruturadas podem ser administradas em dose reduzida, em comparação ao princípio ativo livre.

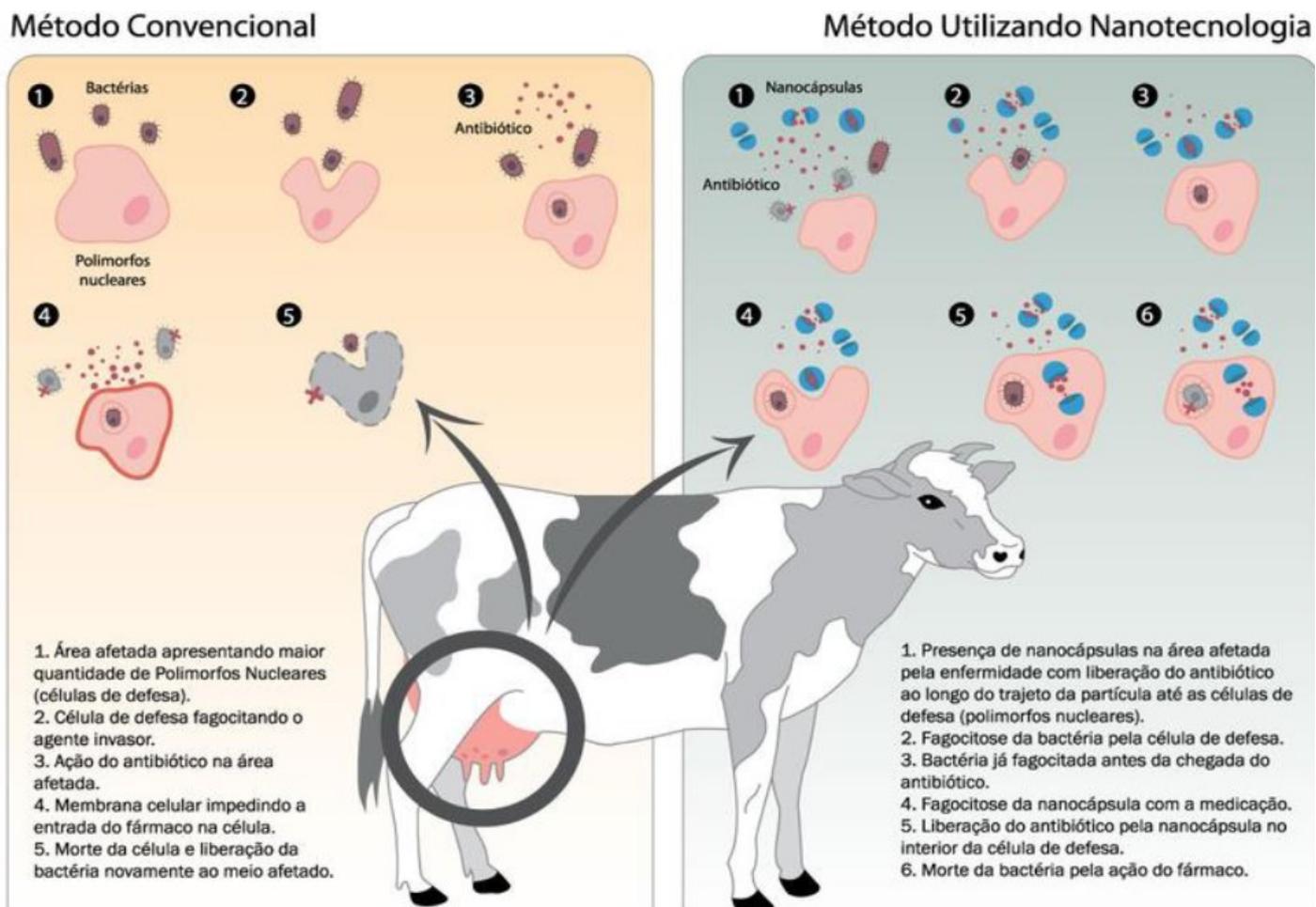
Nesse contexto, seguindo na busca por novas alternativas terapêuticas, a nanotecnologia constitui-se em uma área de crescente interesse na medicina veterinária. Investiga-se a sua utilização como ferramenta capaz de oferecer soluções revolucionárias para problemas extremamente sérios que a produção animal enfrenta, como tuberculose, brucelose, *S. aureus* resistente à meticilina (SARM), febre aftosa e até infecções por patógenos intracelulares ou sanguíneos (El-Sayed e Kamel, 2020). Atualmente, mudanças relacionadas à produção animal têm sido discutidas e almejadas pela população, preocupada com a sustentabilidade, com a saúde humana, com o controle de doenças, com o uso indiscriminado de medicamentos, com o desrespeito ao bem-estar animal e com a segurança alimentar. Neste contexto, a nanotecnologia é vista como uma alternativa promissora à saúde animal, à medicina veterinária e às outras áreas de produção animal, podendo contribuir com novas estratégias de manejo (Kuzma et al., 2010). Nos últimos anos, a aplicação da nanotecnologia na medicina humana e na veterinária mostrou um grande progresso em relação a diversos desafios técnicos, apresentando potencial de impactar a forma como estas comumente são praticadas (Chakravarthi et al., 2010).

No contexto da nanotecnologia, a nanomedicina, definida como a aplicação da nanotecnologia para a prevenção e tratamento de doenças, vem se destacando. O controle de doenças infecciosas é uma área chave na saúde, a exemplo da mastite bovina. O fracasso dos tratamentos antimicrobianos comumente utilizados na terapêutica desta doença, relacionado principalmente à dificuldade de penetração dos ativos em células bacterianas e matrizes de biofilmes, levam a buscar novas alternativas através da aplicação da nanotecnologia. Patógenos causadores da mastite, como *S. aureus*, podem residir fora e dentro das células ou em ambos os locais, e este aspecto por si só já justificaria a utilização de qualquer nanosistema, visto que a internalização de fármacos pelas células de defesa pode ser facilitada por fármacos nanoestruturados (Irache et al., 2011; Figura 9). Sendo assim, uma vez que o patógeno é fagocitado pelas células de defesa, o ativo antimicrobiano pode ser liberado e atingir diretamente as bactérias já fagocitadas, de forma controlada no local onde os patógenos causadores da doença estariam protegidos da ação de qualquer outro medicamento convencional (Castro, 2017). Destaca-se ainda que em alguns casos, o

aumento na atividade de determinado fármaco nanoencapsulado ocorre simultaneamente à diminuição da sua toxicidade, já que sua liberação pode ocorrer especificamente nos locais desejados (Irache et al., 2011).

Em relação à terapêutica da mastite bovina, alguns ativos nanoestruturados estão sendo desenvolvidas visando melhorar a sua eficácia antimicrobiana. Estudos com amoxicilina, cloridrato de levofloxacina, ceftiofur, nanoprópolis, entre outros já foram realizados (Yang et al., 2009; Troncarelli et al., 2013; Liang et al., 2018; Pinheiro Machado et al., 2019). No entanto, percebe-se maior interesse no desenvolvimento de ativos sintéticos nanoestruturados para a terapêutica da doença. Estudos com ativos naturais para essa finalidade terapêutica são ainda pouco considerados, demonstrando a inovação da proposta do presente estudo.

**Figura 9.** Comparação entre o método convencional e o uso de nanocápsulas no combate a patógenos causadores de mastite bovina. Fonte: Castro, 2017.



A possibilidade de substituição de sistemas nanoestruturados em detrimento aos usos subterapêuticos tradicionais de antibióticos, podendo diminuir o desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos comumente usados na medicina humana, também tem sido evidenciada (Kuzma, 2010; Baptista et al., 2018). A substituição dos antibióticos comumente usados pode refletir diretamente na saúde pública (El-Sayed e Kamel 2020; Baptista et al., 2018). Ao fazer isso, pode-se minimizar o problema da resistência aos medicamentos na medicina humana e veterinária e o problema dos resíduos de medicamentos no leite e na carne, principalmente se a nanotecnologia for associada aos produtos naturais antimicrobianos. Além disso, um grande impacto econômico pode ser esperado, minimizando os gastos com medicamentos, com as quantidades de leite descartado e com o número de animais abatidos nos rebanhos leiteiros (El-Sayed e Kamel 2020).

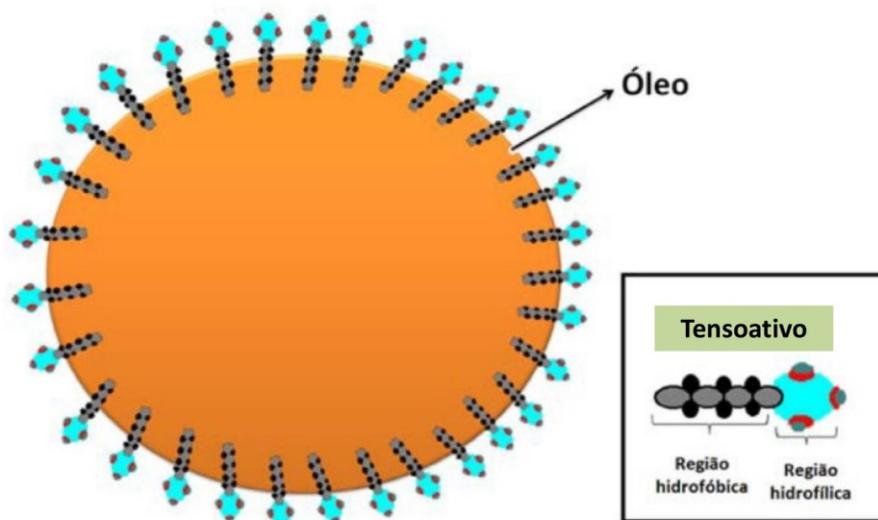
### ***Desenvolvimento de Nanoemulsões***

Dentre os sistemas nanoestruturados para a liberação de fármacos destacam-se as nanoemulsões. As nanoemulsões consistem em uma fina dispersão de óleo em água, estabilizadas por surfactantes, com diâmetro de partículas entre 100 e 600 nm (Bouchemal et al., 2004; Sutradhar and Amin, 2013; Figura 10). Sistemas nanoemulsionados podem conferir proteção aos princípios ativos, restringir o seu acesso aos locais escolhidos aumentando a capacidade de atravessar as barreiras biológicas e liberar o fármaco de forma controlada e sustentada no local de ação (Mohanraj et al., 2006).

Atualmente, são descritos na literatura diversos métodos para a preparação de nanoemulsões, classificados em métodos de emulsificação de baixa ou alta energia (Anton et al., 2008). Os métodos de emulsificação de baixa energia no processo do desenvolvimento das nanoemulsões são aqueles que usam baixa quantidade energética, nos quais as formulações podem ser obtidas desviando as propriedades físico-químicas intrínsecas dos surfactantes, co-surfactantes e excipientes que as compõem (Anton et al., 2008). Por outro lado, a emulsificação de alta energia faz uso de métodos que requerem alta energia mecânica pela utilização de equipamentos ou dispositivos. Nesse caso, a formação das nanoemulsões é governada por parâmetros diretamente controláveis, tais como a quantidade de energia, a quantidade de surfactante e natureza dos componentes (Anto et al., 2008).

Um dos métodos de alta energia utilizados no desenvolvimento e preparo de nanoemulsões é o de homogeneização de alta pressão (HAP). Este tem sido considerado muito eficaz devido à diversas vantagens tais como baixos índices de polidispersão, o que garante maior estabilidade às formulações, permite o uso de altas concentrações de lipídios garantindo melhor dispersão, não requer o uso de solventes orgânicos e ainda possibilita o aumento de escala para produção industrial (Mehnert et al., 2001; Mistry et al., 2012). Esse método consiste, basicamente, de um gerador de alta pressão e um dispositivo de interação, no qual a emulsão processada passa sob alta pressão por uma seção convergente e posteriormente se expande (Mehnert et al., 2001). A operação de HAP envolve principalmente a cavitação e o cisalhamento.

**Figura 10.** Figura representativa da partícula de nanoemulsão. Fonte: Adaptada de Pires et al., 2017.



Quanto à composição, as nanoemulsões podem conter variados tipos de óleos estabilizados com surfactante e ingredientes ativos, que são preferencialmente solubilizados, dispersos e/ou adsorvidos na fase interna da nanoestrutura (Bajerski et al., 2016). Diversos estudos descritos na literatura preveem o uso de óleos vegetais associados à nanoemulsões visando melhorar os reconhecidos benefícios terapêuticos desses óleos (Bajerski et al., 2016). Essa associação pode resultar em melhores respostas biológicas quando comparada a formulações convencionais ou aplicação desses óleos na forma bruta (Bajerski et al., 2016).

O óleo de linhaça dourada (*Linum usitatissimum*) surge como um importante candidato para o desenvolvimento de formulações nanoemulsionadas. O óleo da linhaça

dourada (*L. usitatissimum*) possui uma coloração amarelada, com odor e sabor suave. Contém quantidades consideráveis de glicosídeos e ácidos insaturados, com destaque para o ácido  $\alpha$ -linolênico, ácido linoleico, ácido oleico e alguns ácidos saturados (Khan et al., 2017). Este óleo tem mostrado diversas atividades farmacológicas, tais como antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica, expectorante, diurética, etc (Kaithwas et al., 2011; Khan et al., 2017). A linhaça dourada constitui um importante ingrediente devido ao seu conteúdo de ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA, ácido graxo ômega-3), bem como flavonóides, glicosídeos, fenóis e taninos (Joshi et al., 2014; Kaithwas et al., 2011). A sua aplicação *in vivo e in vitro* para o tratamento da mastite bovina já foi demonstrada, com resultados promissores em ambas as avaliações (Kaithwas et al., 2011). Os autores destacaram que as propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas deste óleo podem contribuir para sua eficácia terapêutica na mastite, sendo o seu uso intramamário considerado um potencial tratamento alternativo para a doença. O potencial antimicrobiano do óleo de linhaça contra cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos também já foi demonstrado (Khan et al., 2017). Sendo assim, a obtenção de sistemas nanoemulsionados pode abrir caminho à novas abordagens para o processamento, estabilização e utilização do óleo de linhaça (*L. usitatissimum*) (Goyal et al., 2014) associado ou não a outros compostos ativos.

Similarmente, o desenvolvimento de nanoformulações carregadas com o extrato de macela também está descrito na literatura, prevendo o seu uso tópico (Zorzi et al., 2016). Nesse estudo, as nanoemulsões desenvolvidas apresentaram distribuição monodispersa, com tamanho de partícula entre 200 – 300 nm, potencial zeta negativo, alta eficiência de encapsulação dos compostos ativos e potencial antioxidante promissor (Zorzi et al., 2016). Em outra abordagem, a fim de otimizar a aplicabilidade do extrato de macela, Bidone et al. (2014), prepararam nanoemulsões de flavonoides extraídos desta planta. Os resultados indicaram que as nanoemulsões são promotoras de absorção potenciais para a distribuição dos flavonoides de *A. saturoioides* nas diferentes camadas de pele. Do Carmo et al. (2015) também avaliaram o potencial do óleo essencial extraído da macela sob diferentes condições de preparo. Os autores compararam o efeito do óleo essencial puro e em nanoemulsões em ratos infectados com *Trypanosoma evansi* e constataram que as nanocápsulas apresentaram maior controle da parasitemia, além de apresentarem efeito anti-anemia, anti-inflamatório e de diminuição de lesões hepáticas.

Diante do exposto, o desenvolvimento de nanoemulsão de linhaça associada ao extrato de macela visando à entrega direcionada dos compostos ativos de interesse é uma alternativa inovadora para o tratamento da mastite bovina. Não existem na literatura, até o

presente momento, estudos da associação dos componentes do extrato da macela ao óleo de linhaça. Tendo em vista que um dos principais entraves para o uso de produtos naturais é a rápida degradação desses compostos quando expostos a luz, oxigênio e temperatura, bem como a necessidade de solubilização em solventes orgânicos (Holzschuh et al., 2010; Harwansh et al., 2019), que limitam o seu uso, a associação destes a sistemas de liberação nanoemulsionados, pode ser uma alternativa no desenvolvimento de novos produtos e novos tratamentos para a mastite bovina. Algharib et al. (2020) destacaram que além da importância dos nanomateriais na proteção dos ativos contra a degradação e entrega ao local infectado, os próprios nanomateriais podem ser citotóxicos e destrutivos para as bactérias por diferentes mecanismos. Nesse contexto, as nanoemulsões podem interagir com a membrana celular bacteriana e levar à sua destruição, gerando espécies reativas de oxigênio, inativação enzimática, desativação de proteínas, alterações na expressão gênica e ainda estimular a imunidade inata e adaptativa ajudando através dessas vias bactericidas a superar o mecanismo de resistência aos antimicrobianos (Algharib et al., 2020). Quando as nanogotículas de óleo entram em contato com as membranas das bactérias, por exemplo, a tensão superficial diminui, o que faz com que a membrana separe, libere os ativos e mate o patógeno (Meena et al., 2018).

### ***Nanoemulsões na Saúde Animal***

O desenvolvimento de nanoemulsões visando à saúde animal, principalmente para o tratamento e a prevenção de doenças, tem mostrado que resultados promissores estão sendo alcançados pelo seu uso como potencial agente de administração de medicamentos (Meena et al., 2018). Um estudo, por exemplo, produziu uma nanoemulsão da mistura de nove óleos vegetais, i.e., de oliva, eucalipto, endro, mamona, hortelã-pimenta, alho, gengibre, girassol e capim-limão com Tween 80® na proporção de 1:4. Os resultados da avaliação desta nanoemulsão mostraram melhoria significativamente da atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *Aspergillus niger* e não apresentaram toxicidade em testes com modelos murinos (Osonwa et al., 2018). O desenvolvimento e uso de nanoemulsões de antimicrobianos convencionais comumente utilizados em animais de produção também têm sido relatados (Zhang et al., 2016). Nesse caso, o florfenicol, o qual possui baixa solubilidade em água, foi utilizado no preparo da formulação para administração em suínos numa dose de 20 mg/kg. Os resultados mostraram uma biodisponibilidade relativa da nanoemulsão formulada aumentada até 134,5%, mostrando assim uma importante

vantagem de uso de nanoemulsões na solubilização de ativos (Zhang et al., 2016). Semelhantemente, o desenvolvimento de nanoemulsões dos compostos lipofílicos cetoprofeno e sulfametazina, livres de solventes, mostraram potencial de aplicação na liberação controlada de ativos pela via injetável ou na administração na dieta líquida de animais de produção como bovinos, aves e suínos (Vandamme e Anton, 2010). Na terapêutica da mastite bovina, diversas nanoemulsões estão sendo desenvolvidas visando melhorar a eficácia de princípios ativos antimicrobianos. Um exemplo foi relatado através do desenvolvimento da nanoemulsão composta de amoxicilina e cloridrato de levofloxacina, a qual mostrou forte efeito bacteriano *in vitro* contra três principais bactérias patogênicas da mastite bovina, i.e., *S. aureus*, *E. coli* e *S. agalactiae* (Yang et al., 2009). Da mesma forma, uma nanoemulsão de ceftiofur em óleo de soja mostrou também o seu efeito antimicrobiano superior contra as principais bactérias patogênicas da mastite bovina quando comparada aos princípios ativos não emulsionados. Este estudo forneceu valores de referência para o uso clínico da nanoemulsão desenvolvida no tratamento de infecções bacterianas (Liang et al., 2018).

As evidências acima expostas mostram que a maior parte dos estudos descritos na literatura associa as nanoemulsões aos antimicrobianos sintéticos. Diante disso, destaca-se a necessidade do desenvolvimento de nanoemulsões a base de produtos naturais para uso na veterinária, com destaque para a terapêutica da mastite bovina, visando contornar os problemas de resistência microbiana e atender os sistemas sustentáveis de produção leiteira. O sucesso do desenvolvimento de nanopartículas de extratos vegetais e outros produtos naturais, as quais têm apresentado resultados promissores, pode encorajar também as pesquisas com as nanoemulsões nessa área (Brandão, 2011; Troncarelli et al., 2013; Baptista et al., 2018; Pinheiro Machado et al., 2019; Algharib et al., 2020).

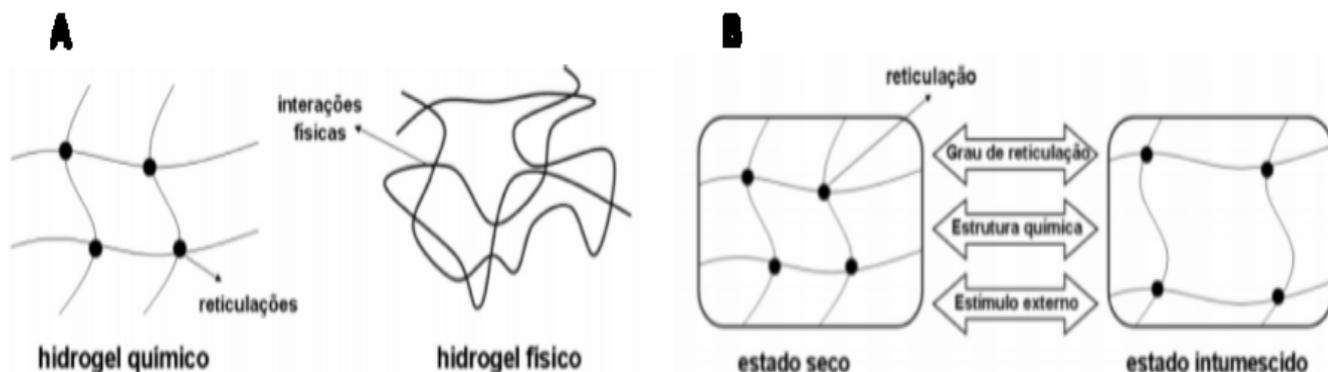
Para além do desenvolvimento, buscando melhorar as propriedades dos sistemas nanoemulsionados para que apresentem de fato as vantagens esperadas do seu uso e possam contribuir com novas alternativas terapêuticas da mastite bovina, é necessária a adequação da sua viscosidade. De forma a viabilizar a aplicação intramamária e modular a liberação dos ativos da nanoemulsão de óleo de linhaça contendo extrato de macela, pode-se propor a sua associação com veículos de liberação lenta. Nesse contexto, polímeros hidrogéis termossensíveis, biocompatíveis e biodegradáveis correspondem a materiais interessantes para o desenvolvimento de veículos compósitos promissores para a nanoemulsão de macela

visando aumentar a viscosidade do sistema, garantindo uma liberação prolongada dos ativos no interior da glândula mamária.

### ***Hidrogéis poliméricos***

Os hidrogéis são redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos que podem absorver e reter grandes quantidades de água ou similares. São formados por cadeias macromoleculares interligadas por ligações covalentes ou interações físicas (Oviedo et al., 2008). Os hidrogéis apresentam alta hidrofiliicidade, que pode ser controlada pela natureza dos grupamentos presentes em suas cadeias, tais como: -OH, -COOH, -CONH, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub>H; e insolubilidade que é afetada diretamente pelo grau de entrelaçamento das cadeias formadoras dos hidrogéis (Oviedo et al., 2008; Aouada & Mattoso, 2009). Os hidrogéis podem ser do tipo químico/permanente ou físico/temporário (Aouada & Mattoso, 2009). Os do tipo químico formam redes que não podem mais ser dissolvidas; já hidrogéis físicos formam redes que podem ser dissolvidas através de um determinado estímulo externo, por exemplo, mudanças de pH, temperatura e solução salina (Aouada & Mattoso, 2009). Quando um hidrogel entra em contato com um meio de intumescimento, como a água, por exemplo, as cadeias poliméricas podem sofrer interações com o meio e provocar uma expansão de suas cadeias, aumentando a distância entre seus retículos e o volume entre as mesmas (Aouada & Mattoso, 2009). Através da atuação de forças osmóticas e elásticas o hidrogel atingirá o seu estado de equilíbrio de entumescimento (Aouada & Mattoso, 2009). A figura 11 mostra um esquema representativo da estrutura de um hidrogel químico e físico, seco e intumescido.

**Figura 11.** Esquema representativo da estrutura de um hidrogel químico e físico (A), seco e intumescido (B). Fonte: Aouada & Mattoso, 2009.



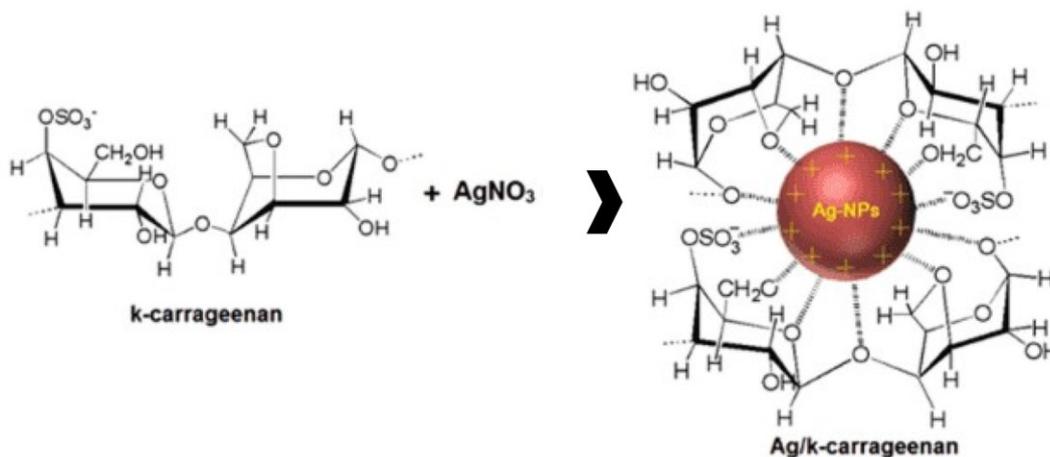
Os hidrogéis podem ser sintetizados a partir de polímeros naturais que podem apresentar vantagens como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, reconhecimentos de moléculas biológicas; e desvantagens como: propriedades mecânicas não satisfatórias, podem conter patógenos e provocar respostas inflamatórias (Lin e Metters, 2007; Aouada & Mattoso, 2009). Outra forma de síntese é a partir de materiais sintéticos que apresentam como principal desvantagem problemas ecológicos e a inexistência de propriedades bioativas, o que diminui o campo de aplicação desses materiais, principalmente nas áreas biomédicas (Aouada & Mattoso, 2009).

Os polímeros naturais têm sido amplamente utilizados na agricultura, área biomédica e engenharias, com diversos fins, com especial destaque para a entrega de fármacos e adequação da viscosidade de formulações (Chen et al., 2006; Distantina et al., 2013). Os polímeros naturais têm sido usados, principalmente, no desenvolvimento de compósitos, através da combinação de materiais pela simples mistura. Os compósitos têm apresentado vantagens de uso em termos de propriedades mecânicas e de barreira, liberação controlada de medicamentos e eficiência de adsorção (Khalil et al., 2017). Desse modo as propriedades de polímeros podem ser otimizadas para produzir materiais com uma boa combinação de características químicas, mecânicas, térmicas e biológicas (Cascone, 1999; Chen et al., 2006). A combinação de materiais naturais no desenvolvimento de compósitos pode ser obtida pelo uso de materiais como o alginato, a carragenana, o ágar, os amidos, a celulose, a quitosana, as mucilagens, etc., os quais têm sido amplamente utilizados para esse fim devido à sua biocompatibilidade, disponibilidade, capacidade de gelificação e eficiência de encapsulamento (Khalil et al., 2017). Nesse contexto, dentre os diversos polímeros naturais, compósitos desenvolvidos a base de k-carragenana e mucilagem de linhaça vêm sendo investigados devido às suas propriedades reológicas e capacidade de formação de gel termorreversível (Chen et al., 2006).

As carragenanas são mucopolissacarídeos extraídos das paredes celulares das algas. Possuem grupos hidrofílicos como carboxila, sulfato e hidroxila que permitem a formação de um gel termorreversível (Distantina et al., 2013; Khalil et al., 2017; Usman et al., 2017). Dentre os tipos existentes, a k-carragenana utilizada no presente estudo é predominantemente obtida por extração da alga tropical *Kappaphycus alvarezii* (Campo et al., 2009). É um polímero linear aniônico composto por um ( $\kappa$ -) sulfato por unidade de dissacarídeo, com capacidade de se auto-associar em estruturas helicoidais capazes de formar géis rígidos (Delattre et al., 2011). As carragenanas têm sido consideradas

importantes polissacarídeos naturais com aplicação em sistemas de administração de fármacos através da fabricação de novos materiais (Khalil et al., 2017; Muhamad et al., 2019). A figura 12 mostra a estrutura química da k-carragenana e como esta pode se estruturar na interação com nanopartículas.

**Figura 12.** Estrutura química da k-carragenana e um esquema de interação com nanopartículas de prata (NP). Fonte: Adaptada de Elsupikhe et al., 2015.



A mucilagem de linhaça, por sua vez, consiste em um polissacarídeo heterogêneo, formado por xilose, arabinose, glicose, galactose, ácido galacturônico, ramnose e fucose, dos quais a ramnogalacturonana I e o arabinoxilano estão presentes em maiores concentrações (Naran et al., 2008). Tem sua origem nas células epidérmicas das cascas das sementes das plantas que após embebição são capazes de liberar grandes quantidades de um tipo de dispersão coloidal em torno da semente (Frey-Wyssling, 1976; Esau, 1977). A figura 13 ilustra o processo de formação da mucilagem de linhaça em água.

**Figura 13.** Sementes de linhaça em água e micrografia da semente contendo vermelho de rutênio mostrando a gelificação da mucilagem através da mancha ao redor da semente. Fonte: Adaptada de Naran et al., 2008.



As funções primárias da mucilagem ainda podem envolver a ajuda na dispersão aderindo aos animais, a resistência a serem varridas pelo vento ou pela chuva ao aderir ao solo, facilitação da hidratação das sementes ou a resistência à dessecação durante uma seca breve, bem como pode servir de material de reserva de nutrientes durante a germinação (Franz, 1989; Gutterman and Shemtov, 1996). Em geral, as cascas das sementes de linhaça possuem de 8 a 12% de mucilagem, sendo dependente das formas de extração (Fedeniuk & Biliaderis, 1994). Seu uso vem sendo investigado devido às suas propriedades reológicas e capacidade de formação de uma solução de origem natural, com aspecto viscoso semelhante a um gel, também com capacidade de uso em formulações farmacêuticas (Warrand et al., 2005; Sangwan et al., 2011; Muhamad et al., 2019). A mucilagem de linhaça possui fraca capacidade de gelificação entre 2- 2,5% (w/w) (Chen et al., 2004; Chen et al., 2006; Hai-Hua et al., 2006) o que justifica o seu uso no desenvolvimento de compósitos farmacêuticos de liberação gradativa de ativos (Hasnain et al., 2018).

Compósitos hidrogéis desenvolvidos a base de k-carragenana e mucilagem de linhaça descritos na literatura mostraram que a mistura destes dois materiais resultou no aumento da viscosidade, assim como foi capaz de permitir maior capacidade de retenção de água (Chen et al., 2006). Em conjunto, a maior viscosidade e a maior retenção puderam ainda contribuir com a redução da sinérese deste compósito, permitindo uma melhor conservação e armazenagem (Chen et al., 2006). Estudos do desenvolvimento de compósitos a base de k-carragenana e mucilagem de linhaça mostraram o potencial da combinação destes materiais na obtenção de um produto de elevado valor tecnológico na indústria farmacêutica (Chen et al., 2006). Entretanto, é importante destacar que o potencial de uso deste compósito em formulações farmacêuticas específicas visando à entrega de ativos, não está descrito na literatura. Encontram-se descritos apenas estudos do uso destes polímeros não combinados (puros) em formulações farmacêuticas. Um exemplo pode ser encontrado através da forte atividade antimicrobiana desenvolvida pela incorporação de ativos antimicrobianos naturais ou sintéticos, como extratos de plantas, extratos de sementes, óleos essenciais e nanopartículas de prata em compósitos de carragenana (Kanmani, 2014; Shojaee et al., 2014a; Shojaee et al., 2014b; Lesnichaya et al., 2010). Da mucilagem de linhaça poucos estudos foram encontrados do seu uso como veículo de formulações. Destacaram-se estudos prévios do desenvolvimento de géis mucoadesivos através de compósitos de mucilagem de linhaça e alginato de sódio carregados com diclofenaco de sódio, os quais mostraram um perfil sustentado de liberação do fármaco por 8 h (Hasnain et

al., 2018); e o uso da mucilagem de linhaça em formulações farmacêuticas que evidenciaram o alto potencial antimicrobiano contra diversos tipos bacterianos através da sua associação à nanopartículas de prata (Haseeb et al., 2016, 2019). Resultado semelhante envolveu o uso da mucilagem de chia combinada com outros materiais para o desenvolvimento de novos compósitos veículos de ativos nanoestruturados com elevada atividade antimicrobiana contra diversos tipos bacterianos, incluindo *S. aureus*, com aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica (Muhamad et al., 2019). Portanto, através da associação da k-carragenana e da mucilagem de linhaça no desenvolvimento de veículos compósitos de ativos naturais antimicrobianos pode-se esperar também uma forte atividade antimicrobiana na terapêutica da mastite bovina.

O compósito hidrogel de k-carragenana e mucilagem de linhaça foi selecionado como veículo transportador da nanoemulsão de macela, i.e., nanocompósito. Nanocompósito pode ser definido como a mistura ou combinação de materiais híbridos em que pelo menos um dos componentes possui dimensões nanométricas (Esteves et al., 2004). Vantagens da preparação de nanocompósitos têm relação com a liberação gradativa de ativos (Arias et al., 2011) associada ao elevado nível de desempenho, possivelmente resultado da sinergia entre os componentes (Esteves et al., 2004). A seleção do compósito k-carragenana e mucilagem de linhaça foi devida às suas características termorreversíveis, ou seja, apresentam-se líquidos quando aquecidos e em estado de gel em temperaturas próximas a 40°C (Chen et al., 2006), e devido também a possível liberação gradativa e prolongada dos ativos nanoestruturados incorporados.

### ***Polímeros naturais na mastite bovina***

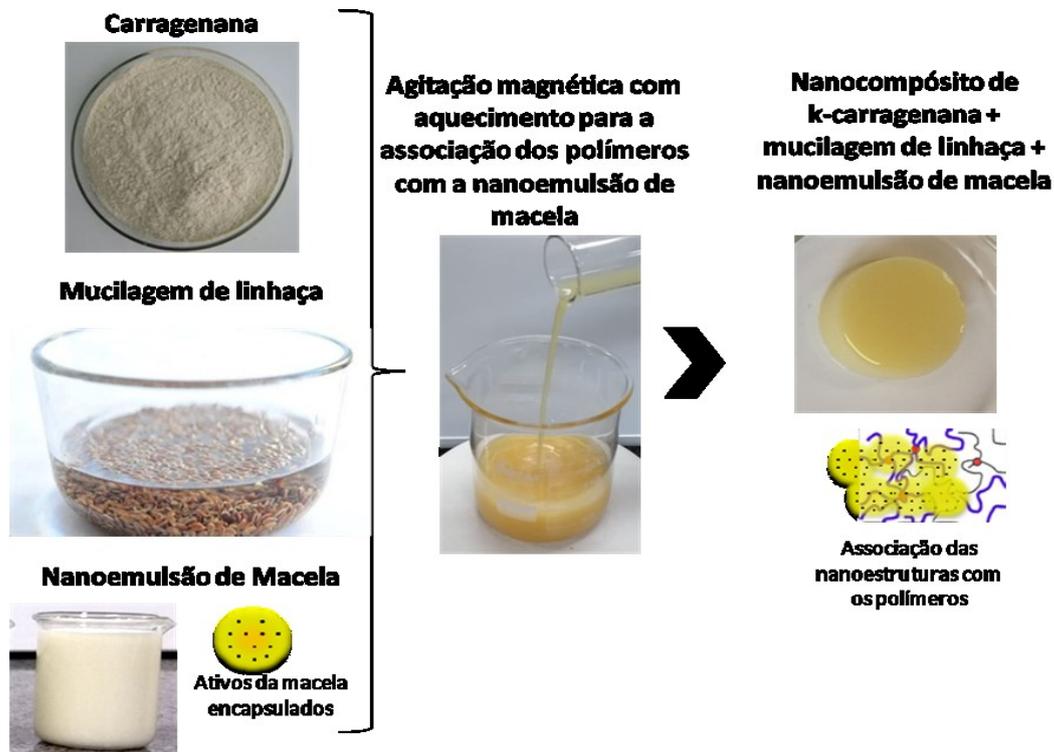
Visando à terapêutica da mastite bovina, alguns polímeros naturais vêm sendo investigados na sua forma pura, em compósitos ou como veículos de ativos antimicrobianos, visando o seu uso externo, intramamário e de contato (Schiavon, 2011; Lanctôt et al., 2016; Krishna et al., 2017; CPRA, 2019; Orellano et al., 2019). O uso empírico da mucilagem de linhaça tem sido relatado em sistemas de produção de leite orgânico no sul do Brasil, como selante antiséptico pós ordenha (Schiavon, 2011; CPRA, 2019). Já para uso intramamário, hidrogéis a base de quitosana têm sido desenvolvidos e estão sendo associados à capacidade de ativação da resposta imune, aceleração da involução da glândula mamária e ao potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus* sp. (Lanctôt et al., 2016; Orellano et al., 2019). A abordagem de uso tópico para o tratamento da mastite foi relatada através do

desenvolvimento de um gel a base de Carbapol e nanopartículas de cobre com comprovada ação antimicrobiana contra *S. aureus* e *Escherichia coli* (Krishna et al., 2017).

Outra proposta mais recentemente desenvolvida prevê a investigação de compósitos nanogéis na terapêutica da mastite bovina, com destaque para o desenvolvimento de nanogéis de cobre, nanogéis de glóbulos vermelhos (RBC), nanopartículas de PLGA carregadas com hidrogel de RGAs, nanogéis de poliacrilamida reticulados com dextrano carregados com nitrato de zinco, nanogéis de partículas de prata, vancomicina carregada com nanogel de carbapol, além do nanogel de ácido benzóico-quitosano carregado com óleos essenciais de alecrim (Zhang et al., 2016; Wang et al., 2015; Malzahn et al., 2014; Ferrer et al., 2014; Mohammed et al., 2018; Mohsenabadi et al., 2018). Esses materiais mostraram efeitos como a neutralização de toxinas relacionadas à *S. aureus* resistentes a meticilina no ambiente extracelular e estimularam a fagocitose bacteriana por macrófagos, bem como, foram estudados como um agente antibacteriano contra essas bactérias. É importante chamar a atenção que nem todos esses materiais são compostos por produtos naturais, muitos têm em sua composição elementos químicos que podem levantar preocupações em termos de segurança de uso. Nesse sentido, ressalta-se a importância do desenvolvimento de polímeros compósitos sustentáveis como veículos de ativos antimicrobinos, as quais podem apresentar inúmeras vantagens de aplicação, principalmente em sistemas alternativos de produção de leite, e também vantagens em termos de propriedades mecânicas e de barreira, liberação controlada de medicamentos e eficiência de adsorção sobre o material à base de polímero puro (Cascone, 1999; Chen et al., 2006; Khalil et al., 2017).

Assim, através do desenvolvimento de novas alternativas baseadas em produtos naturais para a terapêutica da mastite bovina, buscou-se o desenvolvimento de nanocompósitos antimicrobianos a base de mucilagem de linhaça, k-carragenana e nanoemulsão de macela. O objetivo foi obter um veículo com potencial de aplicação intramamária, a partir da variação da proporção polimérica, para a incorporação da nanoemulsão de macela desenvolvida e liberação gradativa dos ativos antimicrobianos (Figura 14).

**Figura 14.** Ilustração esquemática da proposta de desenvolvimento do nanocompósito hidrogel de k-carragenana, mucilagem de linhaça e extrato de *Achyrocline satureioides* incorporado em nanoemulsão.



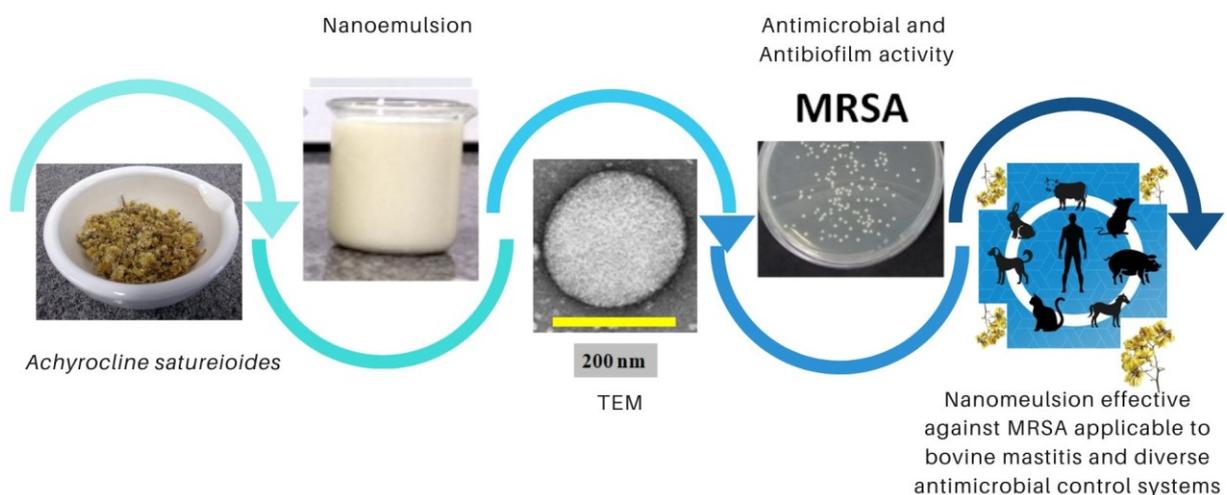
Espera-se do nanocompósito desenvolvido uma alternativa terapêutica sustentável promissora para o tratamento intramamário da mastite bovina, capaz de atender principalmente sistemas alternativos de produção, como o orgânico e o agroecológico, trazendo impactos positivos à saúde em geral, ao bem-estar animal e à sustentabilidade da produção leiteira.

**Formulation and evaluation of anti-MRSA nanoemulsion loaded with *Achyrocline satureioides*: a new sustainable strategy for the bovine mastitis**

Artigo publicado no periódico Nano Express

Pinheiro Machado et al. 2020. Formulation and evaluation of anti-MRSA nanoemulsion loaded with *Achyrocline satureioides*: a new sustainable strategy for the bovine mastitis. Nano Ex. <https://doi.org/10.1088/2632-959X/abbcac>.

Este capítulo traz o estudo de desenvolvimento das nanoemulsões de óleo de linhaça dourada (*Linum usitatissimum*) carregadas com extrato de macela (*Achyrocline satureioides*). As formulações desenvolvidas apresentaram distribuição monodispersa (PdI <0,2), tamanho de partícula aproximado de 200 nm e permaneceram estáveis por mais de 160 dias. Para além do desenvolvimento, as nanoemulsões de macela representaram uma alternativa promissora para o controle de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Esta inovação pode ser aplicável à mastite bovina e a outros diversos sistemas de controle antimicrobiano.

**MACELA-NANOEMULSION**

**Formulation and evaluation of anti-MRSA nanoemulsion loaded with *Achyrocline*  
*satureioides*: a new sustainable strategy for the bovine mastitis**

Gabriela Tasso Pinheiro Machado<sup>a</sup>, Maria Beatriz Veleirinho<sup>a</sup>, Luciana Aparecida Honorato<sup>a</sup>  
and Shirley Kuhnen<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Biochemical and Natural Products Laboratory - LABINAT, Federal University of Santa  
Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil, 88034-001

Short title: Nanobioactives against MRSA

\* Corresponding author: shirley.kuhnen@ufsc.br; Phone: +55-48-3721-2678

## Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) causes mastitis in dairy cattle with serious economic and public health significance. This study developed nanoemulsions of *Linum usitatissimum* oil loaded with *Achyrocline satureioides* (macela) extract and investigated their *in vitro* antimicrobial activity against MRSA. Macela-nanoemulsions (NE-ML) were prepared using high-pressure homogenization (HPH) with different proportions of flaxseed oil, Tween 80 and crude extract. Four majoritarian flavonoids were identified in the macela extract: 3-O methylquercetin, achyrobichalcone, quercetin and luteolin ( $187.3\pm 0.1$ ,  $155.4\pm 11.6$ ,  $76.3\pm 0.1$  and  $30.4\pm 0.0$   $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively). NE-ML nanoemulsions were successfully obtained by the HPH method and showed a milky aspect with yellowish color. The mean particle size was around 200 nm with monodisperse distribution ( $\text{PdI} < 0.2$ ), remaining stable for 160 days at room temperature. When analyzed on a LUMiSizer high-end dispersion analyzer, low values were found ( $\leq 0.5$ ), indicating high stability index, mainly for NE-ML1:5 (0.2). The encapsulation efficiency of macela-nanoemulsions was greater than 94%, considering the four chemical compounds from extract. Minimum inhibitory concentration (MIC) against planktonic bacteria, inhibition of biofilm formation (MBIC), and eradication of MRSA biofilms (MBEC) were determined through *in vitro* tests on microplates. The MIC of NE-ML against planktonic MRSA showed values ranging from 1.2 to 10% (v/v), while blank-nanoemulsions (NE-B, without macela extract) showed values ranging from 6 to 50% (v/v). MBIC and MBEC of NE-ML were 25 and 80% (v/v), respectively. MBIC showed a mass reduction greater than 64%, and MBEC showed a mass reduction greater than 73%. Macela-nanoemulsions (NE-ML), mainly NE-ML1:5, showed high antimicrobial activity and appeared to represent a new alternative of sustainable antimicrobial product for the control of MRSA. Since this innovative nanoemulsion can impact animal health, future research should include *in vitro* and *in vivo* studies to evaluate intramammary therapy and control of MRSA infections in organic and agroecological milk production systems.

**Keywords:** *Achyrocline satureioides*, *Linum usitatissimum*, high-pressure homogenization, sustainable-nanoemulsion, MRSA, biofilm

## Introduction

Mastitis is a highly prevalent disease in dairy cattle (Abebe et al., 2016; Acosta et al., 2016; Busanello et al., 2017), and it is responsible for significant economic losses (Guimarães et al., 2017). Dairy production systems need more effective antimicrobials against bovine mastitis, in particular those that do not cause damage to human and animal health. In organic and agroecological milk production systems in most countries, the management of mastitis is potentially more difficult owing to the restrictions imposed by legislation in relation to the use of antimicrobials and the limited availability of effective treatments (Busato et al., 2000; Pol and Ruegg, 2007; Ruegg, 2009). In organic production, which is on the rise, cases of mastitis are treated mostly with natural products in popular use, but without scientific support, or even with conventional antimicrobials (Honorato et al., 2014; Mushtaq et al., 2018).

*Staphylococcus aureus* is a common cause of bovine mastitis, and its impact is associated with the ability of some strains to form biofilms and acquire mechanisms of resistance to multiple drugs. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is composed of highly virulent bacteria that are difficult to control, making their dispersal a serious public health issue. MRSA is frequently found in samples from dairy cattle, with a prevalence of 1 to 60% (Locatelli et al., 2017; Spohr et al., 2011) of infections, and it is considered an important disease vector. Transmission of MRSA between animals within a herd and from animals to rural workers in contact with the herd has been reported and linked to cases of skin infection, endocarditis and pneumonia (Soavi et al., 2010).

In bovine mastitis, the presence of biofilms has been associated with recurrent infections and unsuccessful treatment (Melchior et al., 2006). Given this context, new strategies to control bovine mastitis are being developed, mainly for organic and agroecological dairy systems, including controlling the formation of and/or eradicating biofilm (Diaz et al., 2010; Gomes and Henriques, 2016; Mubarack et al., 2011; Mushtaq et al., 2018). As such, natural products and plant extracts with proven antimicrobial activity are potential candidates for use in new therapies (Fiordalisi et al., 2016; Pinheiro Machado et al., 2019). Moreover, for plant-derived drugs, the induction of microbial resistance after prolonged exposure is more difficult and represents an important advantage (Domadia et al., 2007; Ohno et al., 2003).

Macela (*Achyrocline satureioides*), a plant native to South America, has a broad spectrum of pharmacological properties, with some of its key biological properties aimed at reducing cytotoxic effect (Rivera et al., 2004; Sabini et al., 2013) and providing cytoprotection (Arredondo et al., 2004; Blasina et al., 2009), as well as having antimicrobial and anti-inflammatory potential (Joray et al., 2013; Mota et al., 2011; Vargas et al., 2013). Several phenolic compounds have been identified in its composition, such as quercetin, luteolin, 3-O methylquercetin and achyrobichalcone (ACB), all of which have been attributed to the plant's biological properties (Arredondo et al., 2004; Polydoro et al., 2004; Retta et al., 2012). Despite the recognized bioactivity of macela, its bioactive compounds have little stability and limited solubility in aqueous solutions (Bidone et al., 2014; 2015). However, the use of nanoemulsion systems for the release of drugs offers a tool that circumvents such limitations, while also supporting active compound permeation, thereby providing prolonged action and increased bioavailability (Harwansh et al., 2019).

Nanoemulsions consist of a fine dispersion of oil in water stabilized by an interfacial film of surfactant molecules. The mean droplet size generally varies from 0.1 to 500 nm (Sutradhar et al., 2013), up to 600 nm, depending on the mechanical energy, composition, and concentration of surfactants (Bouchemal et al., 2004; Jaiswal et al., 2015). Nanoemulsions have advantages such as protection and stability on the active compounds through their encapsulation, while increasing the penetration power of the compounds of interest, resulting in more effective application (Harwansh et al., 2019; Mohanraj and Chen, 2006; Riviere, 2007; Troncarelli et al., 2013). In the present study, golden flaxseed oil (*Linum usitatissimum*) was selected for the oil phase of the developed nanoemulsions because it is a natural product with recognized antimicrobial potential, and its use has been previously tested against gram-positive and gram-negative pathogens in the treatment of bovine mastitis (Joshi et al., 2014; Kaithwas et al., 2011). Golden flaxseed has compounds such as alpha-linoleic acid (ALA, omega-3 fatty acid), flavonoids, glycosides, phenols and tannins, to which different biological activities have been attributed (Joshi et al., 2014; Kaithwas et al., 2011).

A macela-loaded nanoemulsion able to deliver the compounds of interest may, therefore, be a promising strategy to treat bovine mastitis caused by MRSA in various production systems after initial evaluation of its *in vitro* efficacy. Therefore, the present study aimed to develop and characterize a sustainable innovative delivery system of herbal

bioactives, i.e., flaxseed oil nanoemulsions loaded with macela extract, followed by an assessment of their antimicrobial and antibiofilm activities against MRSA.

## **Material and Methods**

### **Macela samples and extract preparation**

Commercial samples were acquired from *Entre Ervas* aromatic and medicinal herbs in southern Brazil (30°02'14.89"S/51°12'39.08"W). Macela extract was prepared by maceration of the inflorescences with 80% ethanol (1:60, w/v) for 10 min. The extracts were then vacuum-filtered, and the organic solvent was removed with a rotary evaporator (60°C). Immediately after solvent removal, the aqueous phase of extract (20 mL) was used to prepare the nanoemulsions.

### **Chemical characterization of macela extract via High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

Analysis of the phenolic composition of the macela extract was performed on a HPLC Thermo Scientific UltiMate 3000 RS Dual System (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) using a Thermo Scientific C18 reverse-phase column (4.6 x 150 mm; 5 µm; 120Å; Acclaim™120, Thermo Scientific®) at 25<sup>0</sup>C, operating at 240, 270, 320 and 375 nm. Mobile phase consisted of Milli-Q® water acidified to pH 2.3 (A) and methanol (B) eluted at 1.0 mL/min flow using the following gradient program: 0-5 min, 90% A; 5-25 min, 30% A; 25-37 min, 90%A. The identification of quercetin, 3-O methylquercetin and luteolin was performed by comparison with retention times of the commercial standards (Sigma-Aldrich). The identification of achyrobichalcone (ACB) was performed at the Galenic Development Laboratory (UFRGS) by comparing retention time with the standard that was isolated and purified according to Carini et al. (2013) and Bianchi et al. (2019). Quantification was based on the integration of the peak areas through the quercetin calibration curve (Sigma-Aldrich; Q4951) (detection interval of 0.97 -1000 µg mL<sup>-1</sup>, R<sup>2</sup> = 1.0, y = 0.168x).

### **Chemical characterization of flaxseed oil via gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS)**

The chemical composition of flaxseed oil was analyzed using gas chromatography coupled to a mass spectrometer (model GCMS-QP2010, Shimadzu, Japan), based on the methodology described by El-Deeb et al. (2004). We used a silica capillary column RTX-5MS (60 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0.2  $\mu\text{m}$ ) and helium as a carrier gas at a flow rate of 25 mL  $\text{min}^{-1}$ . The temperature used varied from 60 to 240°C, with an increase of 10° C  $\text{min}^{-1}$ . The injection was performed in split mode: 1:40, containing 200  $\mu\text{L}$  of sample (200  $\mu\text{L}$  + 400  $\mu\text{L}$  of hexane). Sample derivatization was performed by direct methylation of fatty acids (O'Fallon et al., 2007). Compound identification was performed considering the results found in the mass libraries (GCMSolution software) at the Analysis Center, Department of Chemical Engineering, UFSC.

### **Formulation optimization study**

Nanoemulsions were prepared by the high-pressure homogenization (HPH) method. To optimize the preparation conditions, blank-nanoemulsions (NE-B) were previously prepared using different concentrations of flaxseed oil and surfactant (Tween 80). Briefly, an aqueous phase containing different concentrations of Tween 80 was poured into the oil phase composed of different concentrations of oil under moderate magnetic stirring (Table 1). Details of the procedure used can not be provided at this moment, because the formulation developed in this study is matter of patent registration and industrial secret. Of the 11 NE-B developed, 4 formulations were selected to add macela extractat different concentrations (Table 1).

### **Preparation of macela extract-loaded nanoemulsions (NE-ML)**

Macela-nanoemulsions (NE-ML) were prepared by the high-pressure homogenization (HPH) method, using the same conditions selected in the formulation optimization study, as described above, with the addition of the extractive solutions (20%, v/v) to the oil phase, equivalent to 250 mg of extract. Of the 10 developed NE-ML formulations, 4 formulations that remained stable and presented the desired physicochemical characteristics were selected for further study (Table 1).

**Table 1.** Composition of nanoemulsions with flaxseed oil (NE-B) and macela-loaded nanoemulsion (NE-ML) developed by high-pressure homogenization (HPH).

<b>Composition</b>	<b>NE-B0.2:1</b>	<b>NE-B1:5</b>	<b>NE-B5:5</b>	<b>NE-B5:10</b>	<b>NE-ML0.2:1</b>	<b>NE- ML1:5</b>	<b>NE-ML5:5</b>	<b>NE- ML5:10</b>
Tween 80 (% w/v)	0.2	1	5	5	0.2	1	5	5
Flaxseed Oil (%, w/v)	1	5	5	10	1	5	5	10
Extractive macela solution (% v/v)*	-	-	-	-	20	20	20	20
Water (q.s. to (mL)	100	100	100	100	100	100	100	100

\* In the final composition of the macela nanoemulsions (NE-ML), the extract content corresponded to 2.5 mg mL<sup>-1</sup>. Proportions following NE-B and NE-ML refer to the concentration of Tween 80 and flaxseed oil in the formulations.

### **Characterization of nanoemulsions**

#### ***Mean particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential and pH***

The mean particle size, PDI, and zeta potential were determined by dynamic light scattering (DLS) and Laser Doppler Anemometry, respectively, using a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, United Kingdom). Measurements were made at 25°C. Particle size analyses were performed at a fixed 90° scattering angle. For zeta potential measurements, the samples were placed in electrophoretic cells where a potential of ± 150 mV was established. The zeta potential values were calculated as the mean value of electrophoretic mobility using the Smoluchowski equation (Sze et al., 2003). The pH of the formulations was measured using a pH meter (Hanna HI2221, São Paulo, Brazil).

#### ***Morphology***

The morphology of the formulations previously diluted in ultrapure water was analyzed using transmission electron microscopy (TEM) (JEOL JEM 1011 TEM). Nanoemulsions, previously diluted in ultrapure water, were deposited on carbon-coated copper grids and negatively stained with 2% (w/v) uranyl acetate.

#### ***Accelerated physical stability***

Analysis of the accelerated physical stability of the formulations was performed using a dispersion analyzer (LUMiSizer®; Berlin, Germany). Aliquots (1.0 mL) were placed in individual test tubes (optical path of 2.0 mm) and exposed to centrifugal force at 2300 g for

5 h at 25°C. The analysis time interval was 20 s. This technique generates a numerical instability index, ranging from 0 to 1, with 0 indicating a very stable system and 1 indicating a complete separation of the dispersion (Detloff et al., 2013; Fernandes et al., 2017; Zielińska et al., 2018). Instability index were calculated by the SEPView® software.

### ***Stability studies over time***

To evaluate the stability of nanoemulsions, samples were stored in amber flasks at room temperature (20-25°C) for 160 days. Mean particle size, PDI, zeta potential and pH of samples were all determined after 0, 7, 14, 21, 30, 60, 90 and 160 days, as previously described.

### ***Encapsulation efficiency***

The encapsulation efficiency was determined using the ultrafiltration and centrifugation technique (Mazzarino et al., 2018; Pinheiro Machado et al., 2019), using Amicon Ultracel-100 membrane units (100 kDa, Millipore Corp., Billerica, MA). The encapsulation efficiency was determined to quercetin, 3-O methylquercetin, ACB and luteolin by HPLC, as described above.

### ***In vitro antimicrobial activity***

#### ***Planktonic bacteria***

NE-B and NE-ML were tested against *S. aureus* ATCC 25923 and ATCC 33592, as well as six MRSA strains from mastitic milk, by the broth microdilution method (CLSI, 2006). Initially, milk samples were collected from cows diagnosed with mastitis from pasture-based herds in southern Brazil. Mastitic milk (10 mL) was obtained aseptically from sick cows in sterile tubes. To assist in the diagnosis of mastitis, the California Mastitis Test and the physical examination of the udder were carried out. The samples were taken under refrigeration (4-8°C) and processed immediately for the phenotypic identification of *S. aureus* strains according to Quinn et al. (2011). The strains selected were those that showed resistance profile to Ampicillin, Gentamicin, Neomycin, Oxacillin, Penicillin, Sulfamethazine and Tetracycline by disc diffusion method performed according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2003). The inhibition halos for each tested antimicrobial were interpreted according to the Performance Standards for Antimicrobial

Susceptibility Testing (CLSI, 2006). For each formulation, eight different concentrations were tested against each strain (50 to 0.38% and 10 to 0.78% to NE-B and NE-ML, respectively). Dilutions of nanoemulsions were prepared in 100  $\mu\text{L}$  of Muller Hinton (MH) broth. After dilution, 10  $\mu\text{L}$  of the bacterial inoculum standard corresponding to  $1.15 \times 10^5$  CFU  $\text{mL}^{-1}$  were added to microplate wells and incubated at 35 °C for 24 h. For comparison, the flaxseed oil (50 to 0.3  $\text{mg mL}^{-1}$ ) was dissolved in 1% (w/v) Tween 80 and macela extract (1.2 to 0.0009  $\text{mg mL}^{-1}$ ) was dissolved in 5% ethanol previously to perform the analysis. The vehicles (ethanol and Tween 80) were included as control. The minimum inhibitory concentrations MIC50 represents the MIC value at which 50% of the strains in a test population are inhibited, and MIC90 represents the MIC value at which 90% of the strains within a test population are inhibited (Schwarz et al., 2010). Both were determined as those concentrations that showed no visible growth, which was confirmed by the addition of 50  $\mu\text{L}$  of resazurin dye (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Resazurin is a blue non-fluorescent and non-toxic dye that becomes pink and fluorescent when reduced to resorufin by oxidoreductases within viable cells (Sarker et al., 2007). Additionally, an aliquot of the contents of the wells was removed and placed in a sterile Petri dish containing BHI agar. Replating was performed from the wells containing the concentration that showed no bacterial growth with the addition of resazurin (MIC), as well as those with the two concentrations described above, whenever possible. Plates were incubated for 24 h at  $35 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . After this period, the number of colonies in each plate was assessed, and the reduction in bacterial growth was calculated by comparing bacterial growth that indicated bacteriostatic activity with the initial inoculum control (CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) (Smith-Palmer et al., 1998).

### ***Antibiofilm activity***

We selected NE-ML1:5 for use in *in vitro* antibiofilm tests based on results of the stability study, the physicochemical properties thereof, and the MIC.

### ***Evaluation of biofilm formation***

Initially, *S. aureus* ATCC 25923 and four MRSA strains (614, 534, 406 and 204 strains – Labinat/UFSC) were evaluated for biofilm formation in a 96-well microplate based on the methodology described in Stepanovic et al. (2007) with modifications. For this, cultures were incubated in Tryptic Soy Broth (TSB) supplemented with 1% glucose at  $35^\circ\text{C} \pm 0.2$ .

After 24 h, the culture was diluted in TSB medium to approximately  $1.5 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>, which is equivalent to 0.5 on the McFarland scale. A 200  $\mu$ L aliquot of the culture was placed in quadruplicate in 96-well microplates. Wells containing only TSB were considered the negative control. Plates were then incubated for 48 h, washed three times with sterile phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2), and dried at room temperature. Methanol (200  $\mu$ L) was added to the wells for 15 min for subsequent staining with 2% (w/v) violet crystal. After 20 min, the plates were washed once with PBS to remove excess dye, 200  $\mu$ L of 33% acetic acid were added, and optical density was read at 570 nm (Babsystems, MultiSkan EX).

The strains were then classified as follows: optical density (OD):  $OD \leq OD_c$  = does not produce biofilm;  $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$  = weak biofilm producers;  $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$  = moderate biofilm producers; and  $4 \times OD_c < OD$  = strong biofilm producers. To determine the antibiofilm activity of formulation, the strong and moderate biofilm-producing strains (n= 4) and ATCC 25923 were used.

### ***Prevention of biofilm formation***

Following the steps described above, the *S. aureus* culture cultivated for 48 h was diluted in fresh TSB at a concentration of  $1.5 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> (0.5 McFarland scale). An aliquot (200  $\mu$ L) of diluted *S. aureus* culture was added to the microplate, and concentrations of NE-ML1:5 formulation (25, 10 and 5% v/v) were added to the wells with and without inoculum. Negative (TSB broth) and positive (inoculum without the addition of NE-ML1:5) controls were included in the tests. The effect of blank-nanoemulsion (NE-B 1:5 25, 10 and 5% v/v) and Tween 80 (2.5 to 0.5 mg mL<sup>-1</sup>) on biofilm formation was tested earlier. The plates were incubated at  $35 \pm 0.2$  °C for 48 h. Washing and staining were performed following the method described above. The percentage of inhibition of biofilm growth was determined by reading the absorbance at 570 nm with a microplate reader (SpectraMax® 190 Microplate Reader from Molecular Devices Corp.) and calculating according to Eq. 1, as  $IB (\%) = [1 - (AT / AI) \times 100]$ , where IB is the inhibition of biofilm growth, AT is the mean absorbance of the nanoemulsion concentrations tested with inoculum subtracted from the absorbance value of the same nanoemulsion concentrations without the addition of inoculum, and AI is the mean absorbance of biofilm growth control. The minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC) was considered as the concentration in which the absorbance  $\leq$  negative control (Adukwu et al., 2012). Simultaneously, on a second microplate, the results

were confirmed by the addition of resazurin dye to enable a correlation between the biofilm biomass and the metabolic activity of viable bacterial cells.

### ***Eradication of formed biofilm***

Antibiofilm activity was evaluated using biofilm that had been preformed for 48 h. After this period, the culture medium in the wells containing biofilm was removed and immediately changed with new medium (control) or medium containing different concentrations of the NE-ML1:5 formulation (80, 50, 25, 12 and 5% v/v). A negative control containing only medium was also included in the tests. The plates were re-incubated for 24 h at 35 °C ± 0.2°C, subsequently stained with violet crystal (2%), and the absorbance was measured as described above. After staining, the reduction of biofilms exposed to different concentrations of NE-ML1:5 was also analyzed using inverted optical microscopy (Olympus IX81). The concentration at which already established biofilms were removed from the bottom of treated wells was determined as the minimum biofilm eradication concentration (MBEC) (Adukwu et al., 2012). Separately, MBEC ≥ 70 % was also confirmed by the addition of resazurin dye.

### **Statistical analyses**

Statistical analyses were performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test, using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). For the antimicrobial assays with planktonic bacteria, the data underwent logarithmic transformation. Values of  $P < 0.05$  were considered significant. The data were presented as mean ± standard error of the mean (SEM).

### **Results and Discussion**

In the present work, we aimed to incorporate macela extract into a nanoemulsion formulation to develop an innovative, sustainable drug delivery system based on herbal bioactives. For each new nanoemulsion system developed, a systematic study of composition and water/oil/surfactant ratio was carried out in order to find the most stable conditions and the best performance against MRSA for use in bovine mastitis therapy. Macela extract and flaxseed oil were chosen for the composition of the nanoemulsions owing to their antimicrobial ability (Joray et al., 2013; Joshi et al., 2014; Kaithwas et al., 2011; Vargas et al., 2013). Studies have reported on both to treat bovine mastitis, but never

combined in a nanoformulation. Thus, we sought to bring this combined composition to a macela-nanoemulsion formulation, optimize it, and apply the resulting product as an antimicrobial agent against pathogens that cause bovine mastitis, in particular MRSA known to be highly pathogenic in mastitic milk. In doing so, we consider the potential of using this delivery system in organic and agroecological systems.

### **Chemical characterization of macela extract**

Four majoritarian flavonoids were identified *via* HPLC in the macela extract: 3-O methylquercetin, ACB, quercetin and luteolin at concentrations of  $187.3 \pm 0.1$ ,  $155.4 \pm 11.6$ ,  $76.3 \pm 0.1$  and  $30.4 \pm 0.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. These results are consistent with previous studies showing similar flavonoid compounds in macela (Retta et al., 2012). ACB (4,2',4'',2'''-tetrahydroxy-6',6'''-dimethoxy-4'-O-4''-bichalcone) was recently isolated from samples of macela inflorescences from southern Brazil (Bianchi et al., 2019; Carini et al., 2013; Holzschuh et al., 2010). In the present study, the high concentration of ACB is important, essentially because chalcones are precursors of flavonoid biosynthesis in plants (Yerragunta et al., 2013). In addition, numerous biological properties have been attributed to flavonoid compounds in macela, such as antimicrobial activity (Joray et al., 2013).

### **Chemical characterization of flaxseed oil**

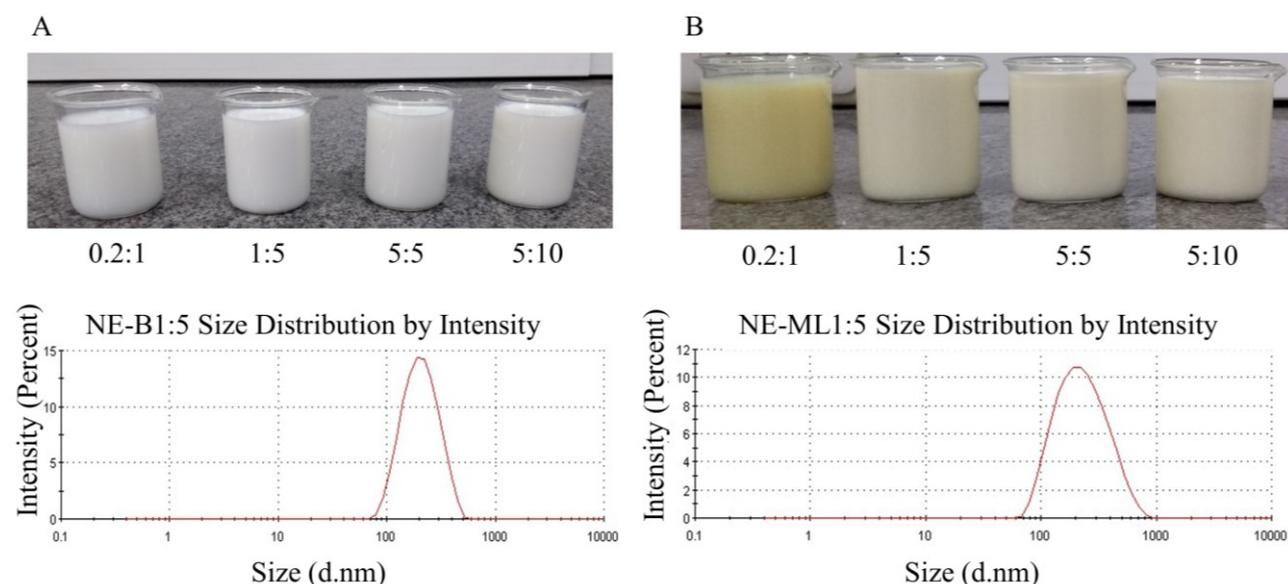
Analysis of the flaxseed oil sample revealed the presence of unsaturated fatty acids, principally linoleic (LOA), alpha-linolenic and oleic, at concentrations of  $30.5\% \pm 0.1$ ,  $30.7\% \pm 0.1$  and  $25.7\% \pm 0.1$ , respectively, in relation to the total percentage of fatty acids in the sample. Other compounds identified were palmitic acid (7.2%) and stearic acid (4.2%). These results corroborate those of Joshi et al. (2014) and Kaithwas et al. (2011) who reported the presence of fatty acids, such as palmitic acid (5.5%), stearic acid (4.6%), oleic acid (19.0%), linoleic acid (13.6%) and alpha-linolenic acid (57.38%), in the composition of golden flaxseed oil. This oil has shown antimicrobial, anti-inflammatory, analgesic, expectorant, and diuretic activities (Kaithwas et al., 2011; Khan et al., 2017).

## Formulation optimization study and characterization of nanoemulsions

### *Mean particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential, pH and morphology*

Nowadays, a variety of methods for the preparation of nanoemulsions are described in the literature. Among high-energy emulsification techniques, the high-pressure homogenization method has some advantages, such as low polydispersity, better dispersion of formulations with high lipid concentration, avoidance, or low volumes, of organic solvents, quick preparation and feasibility of scale-up for large-scale production (Mistry et al., 2012). In this study, nanoemulsions were successfully obtained by the HPH method.

Flaxseed oil nanoemulsions (NE-B) and macela-nanoemulsions (NE-ML) showed a milky aspect with white and yellowish color, respectively. They were homogeneous, without the formation of precipitation or phase separation during the period of analysis (Figure 1).



**Figure 1.** (A) Physical appearance of the nanoemulsions with flaxseed oil (NE-B) developed by high-pressure homogenization (HPH) and droplet-size distribution of NE-B1:5. (B) Physical appearance of the macela-loaded nanoemulsion (20%, v/v equivalent to 2.5 mg mL<sup>-1</sup> of extract; NE-ML) and droplet-size distribution of NE-ML1:5. Proportions following NE-B and NE-ML refer to the concentration of Tween 80 and flaxseed oil in the formulations.

Different particle sizes and ZP values were found among the NE-B formulations (Table 2). The formulations with higher oil and surfactant content presented the smallest particle sizes

and the smallest ZP in module ( $P < 0.05$ ). Significant changes in mean particle size and pH were detected among the NE-ML formulations (Table 2). Higher pH of NE-ML1:5 may have contributed to the production of larger droplet sizes (Sharma et al., 2006). NE-ML1:5 presented the largest particle size (Table 2), likely based on lower concentration of surfactant. NE-ML5:5, for example, had the same composition as NE-ML1:5, except for a higher concentration of Tween 80 (Table 1). In this sense, it should be emphasized that surfactant concentration must be enough to stabilize the micro-droplets of a nanoemulsion (Jaiswal et al., 2015), contributing to the establishment of an adequate ZP and viscosity in order to confer optimal stability.

**Table 2.** Mean particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential (ZP) and pH of the nanoemulsions with flaxseed oil (NE-B) and macela-loaded nanoemulsions (NE-ML) at day zero.

Characteristic	NE-B0.2:1	NE-B1:5	NE-B5:5	NE-B5:10
Size (nm)	251.4 ± 6.0 <sup>a</sup>	227.0 ± 3.6 <sup>b</sup>	212.8 ± 2.5 <sup>b</sup>	187.7 ± 3.5 <sup>c</sup>
PdI	0.19 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.0 <sup>a</sup>
ZP (mV)	-37.6 ± 1.8 <sup>a</sup>	-30.6 ± 0.9 <sup>b</sup>	-27.1 ± 1.2 <sup>b</sup>	-26.1 ± 1.7 <sup>b</sup>
pH	4.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.2 ± 0.1 <sup>a</sup>
	NE-ML0.2:10	NE-ML1:5	NE-ML5:5	NE-ML5:10
Size (nm)	229.8 ± 4.8 <sup>a</sup>	249.9 ± 2.6 <sup>b</sup>	222.3 ± 2.0 <sup>a</sup>	203.9 ± 2.7 <sup>c</sup>
PdI	0.19 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.0 <sup>a</sup>
ZP (mV)	-40.3 ± 1.0 <sup>a</sup>	-39.9 ± 2.7 <sup>a</sup>	-38.6 ± 2.5 <sup>a</sup>	-34.5 ± 0.9 <sup>a</sup>
pH	4.8 ± 0.0 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	4.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	4.7 ± 0.0 <sup>a</sup>

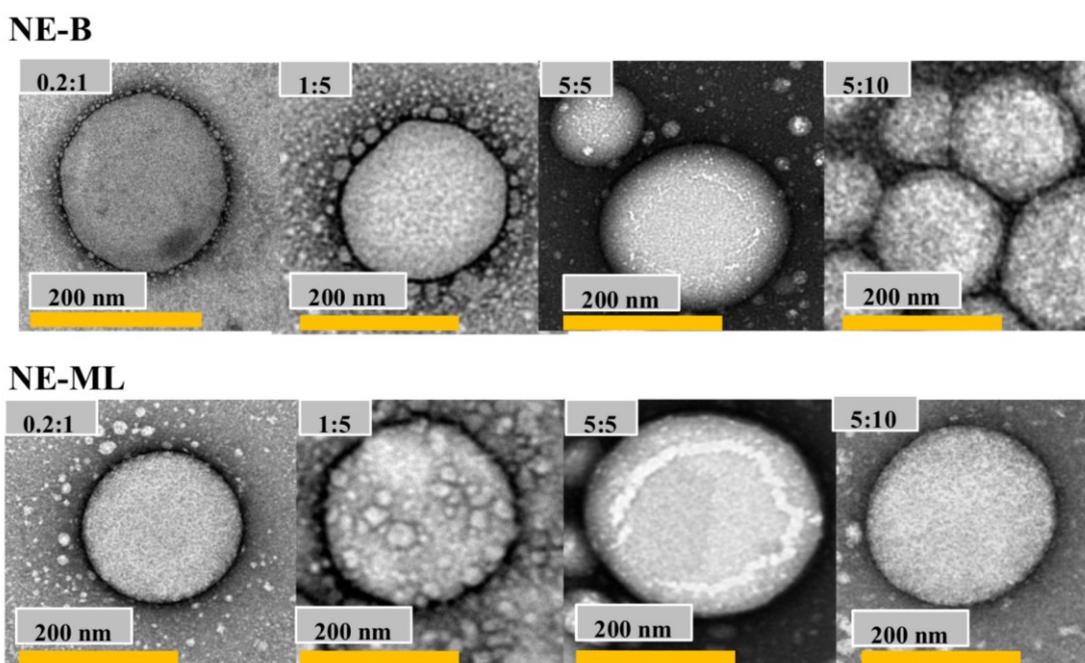
Mean followed by different letters in the same row represents significant differences among NE-B or NE-ML nanoemulsions (Tukey,  $P < 0.05$ ). The data are presented as mean ± SEM ( $n = 3$ ). Proportions following NE-B and NE-ML refer to the concentration of Tween 80 and flaxseed oil in the formulations.

Nanoemulsions can be prepared with low concentrations of surfactant (Bouchemal et al., 2004). In the present study, a tendency toward decreased particle size arose with an increased amount of surfactant. A similar result was found in the development of jabuticaba nanoformulations, also prepared using HPH with different levels of surfactant (Mazzarino et al., 2018). In this case, when the concentration of Tween 80 increased from 1 to 10% (w/v), the particle size of the developed formulations decreased to about 100 nm, despite the same oil concentration and homogenization pressure (Mazzarino et al., 2018).

Comparing the ZP values between the NE-B and their respective NE-ML, we note that the addition of macela extract to the formulations increased the values in module (Table 2).

Similarly, a previous study (Bidone et al., 2014) identified a progressive increase of ZP after the addition of macela extract to coconut oil and Tween 80-based formulations. The authors suggest a possible adsorption of the extract compounds at the oil/water interface. It is important to highlight that the PdIs of all formulations developed were  $\leq 0.2$ , indicative of their stability and monodispersity, highlighting the PDI value found for the NE-ML1: 5 (PDI = 0.17).

In the present study, transmission electron microscopy (TEM) of NE-B and NE-ML formulations showed particles with a spherical shape and size similar to that obtained by DLS (Figure 2; Table 2).



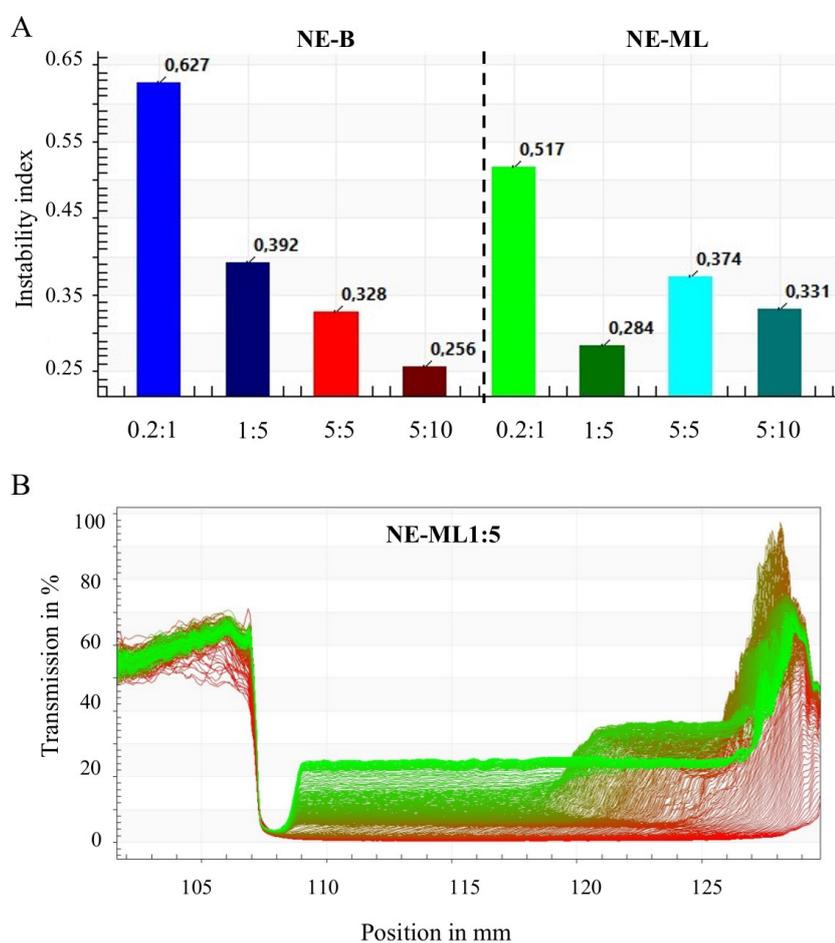
**Figure 2.** Transmission electron micrographs of the nanoemulsions with flaxseed oil (NE-B) and macela-loaded nanoemulsion (NE-ML). Scale bar 200 nm. Proportions following NE-B and NE-ML refer to the concentration of Tween 80 and flaxseed oil in the formulations.

## Characterization of nanoemulsions

### *Accelerated physical stability*

In this study, LUMiSizer® was used to assess the stability of the developed nanoemulsions. In this analysis, the centrifugal separation, in which the variation of transmitted light is recorded, provides information on the kinetics of the process of separation and migration of

the particles (Zielińska et al., 2018). The instability index creates a dimensionless number, ranging from 0 (more stable) to 1 (more unstable) (Fernandes et al., 2017). All developed formulations showed instability index between 0.2-0.6, indicating that the physical stability of the nanoemulsions was maintained (Detloff et al., 2013; Fernandes et al., 2017). The physical stability studies showed that the formulation NE-ML1:5 presented the best stability among all macela-loaded nanoemulsions (Figure 3). NE-ML1:5 also showed the lowest PDI value among the developed nanoemulsions (Table 2). Together, these characteristics show that optimization of this formulation was achieved through oil and surfactant concentrations. It should be noted that NE-B0.2:1 and NE-ML0.2:1, with lower flaxseed oil and surfactant content, showed higher instability values closer to 1.



**Figure 3.** (A) Instability index for the nanoemulsions with flaxseed oil (NE-B) and macela-loaded nanoemulsion (NE-ML) after 5 h at 2300 g and at 25°C. (B) TEM profiles obtained during centrifugation of NE-ML1:5. Proportions following NE-ML refer to the concentration of Tween 80 and flaxseed oil in the formulations.

### Stability studies over time

Macroscopic analysis of nanoemulsions over a period of 160 days showed no visual alterations or signs of phase separation. Regarding the parameters analyzed, no significant changes were found for NE-B (Table 3). On the other hand, minimal alterations were found only for NE-ML0.2:1 in relation to mean particle size (Table 3). These results are consistent with those found in the physical stability analysis (Figure 3), which showed a tendency toward destabilization with lower oil and surfactant content (NE-ML0.2:1).

**Table 3.** Mean particle size, polydispersity index (PdI), zeta potential (ZP) and pH of the nanoemulsions with flaxseed oil (NE-B) and macela-loaded nanoemulsions (NE-ML) over 160 days of storage at room temperature.

Characteristic		NE-B 0.2:1	NE-B 1:5	NE-B 5:5	NE-B 5:10
Size (nm)	Day 0	251.4 ± 6.0 <sup>a</sup>	227.0 ± 3.6 <sup>a</sup>	212.8 ± 2.5 <sup>a</sup>	187.7 ± 3.5 <sup>a</sup>
	Day160	243.1 ± 8.4 <sup>a</sup>	229.8 ± 2.6 <sup>a</sup>	214.6 ± 4.1 <sup>a</sup>	187.0 ± 6.9 <sup>a</sup>
PdI	Day0	0.19 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.0 <sup>a</sup>
	Day160	0.23 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.0 <sup>a</sup>
ZP (mV)	Day0	-37.6 ± 1.8 <sup>a</sup>	-30.6 ± 1.9 <sup>a</sup>	-27.1 ± 1.2 <sup>a</sup>	26.1 ± 2.4 <sup>a</sup>
	Day160	-36.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	-33.5 ± 2.3 <sup>a</sup>	-28.1 ± 4.4 <sup>a</sup>	24.2 ± 2.3 <sup>a</sup>
pH	Day0	4.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.2 ± 0.1 <sup>a</sup>
	Day160	4.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.3 <sup>a</sup>
		NE-ML 0.2:1	NE-ML 1:5	NE-ML 5:5	NE-ML 5:10
Size (nm)	Day0	229.8 ± 4.8 <sup>a</sup>	249.9 ± 2.6 <sup>a</sup>	222.3 ± 2.0 <sup>a</sup>	203.9 ± 2.7 <sup>a</sup>
	Day160	210.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	240.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	222.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	207.7 ± 0.6 <sup>a</sup>
PdI	Day0	0.19 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.0 <sup>a</sup>
	Day160	0.20 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.0 <sup>a</sup>
ZP (mV)	Day0	-40.3 ± 1.0 <sup>a</sup>	-39.9 ± 2.7 <sup>a</sup>	-38.6 ± 2.5 <sup>a</sup>	-34.5 ± 0.9 <sup>a</sup>
	Day160	-40.5 ± 0.9 <sup>a</sup>	-38.2 ± 1.5 <sup>a</sup>	-39.2 ± 1.2 <sup>a</sup>	-31.2 ± 1.5 <sup>a</sup>
pH	Day0	4.8 ± 0.0 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	4.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	4.7 ± 0.0 <sup>a</sup>
	Day160	5.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	4.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	4.8 ± 0.0 <sup>a</sup>	4.8 ± 0.0 <sup>a</sup>

Mean followed by different letters in the same column and for the same characteristic represents significant differences between NE-B or NE-ML at 0 and 160 days (Tukey, P <0.05). The data are presented as mean ± SEM (n = 3). Proportions following NE-B and NE-ML refer to the concentration of Tween 80 and flaxseed oil in the formulations.

These results showed the importance of performing studies on development, optimization and monitoring of the stability to ensure that only the most stable systems will attain the best biological responses.

### ***Encapsulation efficiency***

The encapsulation efficiency of macela compounds in nanoemulsions was greater than 94%. This parameter was calculated considering the four majoritarian chemical compounds found in macela inflorescences, i.e., 3-O methylquercetin, ACB, quercetin and luteolin. The only difference found among the formulations was lower 3-O methylquercetin encapsulation efficiency for NE-ML0.2:1 ( $94.2 \pm 0.9$ ). For the other compounds, the encapsulation efficiency was greater than 95.7%, with values close to 99%. High encapsulation efficiency values found in the present study suggest an affinity between the major flavonoids found in macela and either flaxseed oil or surfactant. High encapsulation of the extract compounds is relevant since nanoemulsion can offer protection from degradation. Protection of active compounds from hydrolysis and degradation is one of the most important functions of nanoemulsions (Jaiswal et al., 2015). Results similar to those of the present study were previously found with an association efficiency of almost 100% between macela flavonoids and the oil nucleus of nanoemulsions (Bidone et al., 2014).

### ***In vitro antimicrobial activity***

#### ***Planktonic bacteria***

For the planktonic phase, through broth microdilution, it was possible to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of macela extract, flaxseed oil and the developed nanoemulsions NE-B and NE-ML (Table 4).

**Table 4.** Count ( $\log_{10}$  CFU mL<sup>-1</sup>) of *S. aureus* ATCC 25923, ATCC 33592 and six MRSA strains from mastitic milk (mean  $\pm$  SEM), using an initial inoculum population density of  $1.5 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup>, following exposure to macela extract, flaxseed oil, NE-ML and NE-B at MIC50\* and MIC90\* concentrations.

Formulations	MIC	Concentration	Control ( $\log_{10}$ CFU mL <sup>-1</sup> )	Count ( $\log_{10}$ CFU mL <sup>-1</sup> )
Macela extract	MIC50	0.07 mg mL <sup>-1</sup>	5.2 $\pm$ 0.0	2.4 $\pm$ 0.0
	MIC90	0.31 mg mL <sup>-1</sup>	5.2 $\pm$ 0.0	2.3 $\pm$ 0.1
Flaxseed oil	MIC50	25 mg mL <sup>-1</sup>	5.3 $\pm$ 0.0	2.5 $\pm$ 0.0
	MIC90	50 mg mL <sup>-1</sup>	5.3 $\pm$ 0.0	2.5 $\pm$ 0.1
NE-ML0.2:1	MIC50	5% (v/v)	5.3 $\pm$ 0.0	2.4 $\pm$ 0.1
	MIC90	5% (v/v)	5.3 $\pm$ 0.0	2.5 $\pm$ 0.8
NE-ML1:5	MIC50	1.2% (v/v)	5.3 $\pm$ 0.0	2.4 $\pm$ 0.0
	MIC90	5% (v/v)	5.3 $\pm$ 0.0	2.0 $\pm$ 0.1
NE-ML5:5	MIC50	5% (v/v)	5.3 $\pm$ 0.0	2.6 $\pm$ 0.0
	MIC90	5% (v/v)	5.3 $\pm$ 0.0	2.6 $\pm$ 0.0
NE-ML5:10	MIC50	5% (v/v)	5.2 $\pm$ 0.0	2.4 $\pm$ 0.1
	MIC90	10% (v/v)	5.3 $\pm$ 0.0	2.6 $\pm$ 0.0
NE-B0.2:1	MIC50	50% (v/v)	5.3 $\pm$ 0.0	2.3 $\pm$ 0.0
	MIC90	50% (v/v)	5.3 $\pm$ 0.0	2.3 $\pm$ 0.0
NE-B1:5	MIC50	12 % (v/v)	5.3 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 0.1
	MIC90	25% (v/v)	5.3 $\pm$ 0.0	2.7 $\pm$ 0.0
NE-B5:5	MIC50	6% (v/v)	5.3 $\pm$ 0.0	2.7 $\pm$ 0.1
	MIC90	25% (v/v)	5.3 $\pm$ 0.0	2.6 $\pm$ 0.1
NE-B5:10	MIC50	6% (v/v)	5.2 $\pm$ 0.0	2.5 $\pm$ 0.2
	MIC90	25% (v/v)	5.3 $\pm$ 0.0	2.6 $\pm$ 0.9

Proportions following NE-ML and NE-B refer to the concentration of Tween 80 and flaxseed oil in the formulations. \* MIC50 represents the MIC value at which 50% of the strains in a test population are inhibited, and MIC90 represents the MIC value at which 90% of the strains within a test population are inhibited.

Macela extract, flaxseed oil and nanoemulsions NE-B and NE-ML reduced microbial growth of MRSA strains from mastitic milk (Table 4). However, the MIC of nanoemulsified

flaxseed oil (NE-B) was about four times lower than that of pure oil (Table 4). This result may be related to the reduction in particle size of flaxseed oil when nanoemulsified, which allows for greater penetration power and, consequently, greater antimicrobial potential. Similarly, previous study showed the greater antimicrobial activity for flaxseed oil nanoemulsions at the expense of pure oil (Hashim et al., 2019). It is important to note that the use of flaxseed oil *in vivo* and *in vitro* for the treatment of bovine mastitis has been previously reported, showing promising results in both evaluations (Kaithwas et al., 2011). However, to date, no studies have reported the use of flaxseed oil nanoemulsions in the context of mastitis. For NE-B, MIC<sub>50</sub> was also influenced by oil concentration and mean particle size. In this case, a higher oil concentration was related to smaller particle sizes and lower MIC values. A previous study reports that the main parameter in determining the antimicrobial efficiency of oils appears to be their concentration in the aqueous phase, rather than the average droplet size of the systems (Donsì et al., 2012).

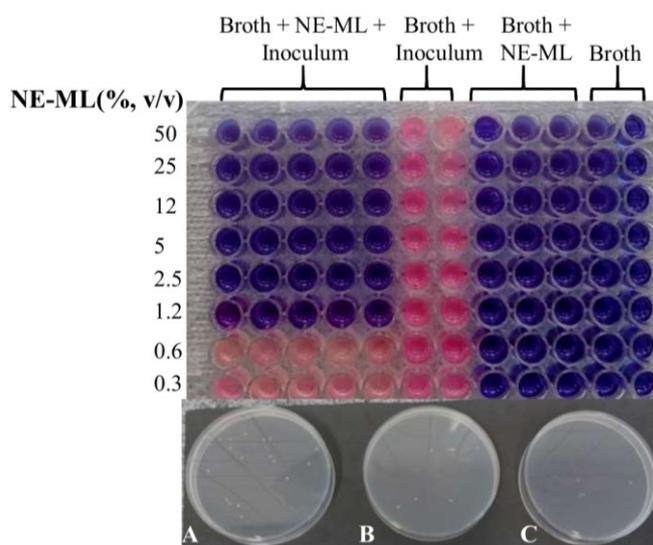
It is important to note that the MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> of NE-ML were lower than those of NE-B, showing that the macela extract in NE-ML nanoemulsions is responsible for the greater antimicrobial activity (Table 4).

Among the NE-ML formulations, different MIC<sub>50</sub> values were found, with particularly interesting results for NE-ML1:5. Although NE-ML formulations have the same concentration of macela extract, different MIC values may result from differences in flavonoid solubility in different media of each nanoemulsion. The greatest antimicrobial potential found for this nanoemulsion may be related to the fact that nanoemulsions are responsive to a blend of oil and surfactant. The right blend of flaxseed oil and surfactant (Tween 80) from NE-ML1:5 may have produced the best solubility of the macela extract and, consequently, the best antimicrobial response. In this context, for the new system herein presented, the optimum flaxseed oil and surfactant (Tween 80) ratio providing the most stable system (Figure 3) and the best PdI value (Table 2) was found for NE-ML1:5. This improved performance also provided the highest antimicrobial response of this formulation. In this context, MIC may also be influenced by the general characteristics of the formulation. For example, variations in the proportions of composites used in its development can alter its characteristics, particularly in terms of solubility of active compounds. Such changes can confer different characteristics on the formulations, in turn, resulting in different biological properties. Varying MIC values of the same active compound may be related to differences in solubility of the active compounds in the culture

media (Wu et al., 2008). In this context, it is likely that the combination of oil and surfactant concentrations present in the composition of NE-ML1:5 provided the best solubilization of the active compounds and, consequently, the highest antimicrobial activity (Donsi et al., 2012).

The MIC of macela extract was higher than that of nanoemulsions (NE-ML), except for NE-ML5:10. NE-ML1:5 showed a MIC<sub>50</sub> lower than the extract, i.e., 1.2% (v/v) of the formulation (equivalent to 0.03 mg mL<sup>-1</sup> of extract; Table 4). For NE-ML0.2:1 and 5:5, the MIC<sub>90</sub> was 5% (v/v) (equivalent to 0.125 mg mL<sup>-1</sup> of extract), while the MIC<sub>90</sub> of the extract was 0.31 mg mL<sup>-1</sup>. These results showed the greater antimicrobial activity of these macela-nanoemulsions. However, NE-ML5:10 was the only formulation that did not show superior antimicrobial activity of the macela extract. It is important to note that the antimicrobial activity of NE-ML was assessed and maintained after the 160-day storage period (results not shown).

For nanoemulsions, it is important to remember that the encapsulation of active compounds has several advantages, including longer action time (because active compounds are gradually released), protection against degradation and better permeation and penetration (Harwansh et al., 2019; Troncarelli et al., 2013). The results of the antimicrobial activity were confirmed by addition of resazurin dye (Figure 4). Resazurin dye (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) has been broadly used as an indicator of cell viability in several types of assays, including bacteria (Sarker et al., 2007). The reduction of resazurin to resorufin is the result of mitochondrial activity, which correlates with the number of live organisms.



**Figure 4.** Microplate showing planktonic bacterial activity after exposure to different concentrations of NE-ML 1:5 formulation [pink colour indicates growth, and blue means inhibition of growth]; Petri dishes indicate the replating of wells containing (A) the concentration that showed no bacterial growth with the addition of resazurin, i.e., MIC (1.2%), and those (B and C) with the two concentrations described above (2.5 and 5%). Proportions following NE-ML refer to the proportion of Tween 80 and flaxseed oil in the formulations (1:5).

The antimicrobial activity of macela-loaded nanoemulsion represents an important finding in the fight against MRSA-linked bovine mastitis. The problem of antimicrobial resistance is a global phenomenon that poses risks to humans and animals. Despite the recognized biological properties attributed to macela, few studies have investigated its use in the control of bovine mastitis caused by MRSA. Previous analyses have shown the antimicrobial potential of macela, showing the bactericidal and bacteriostatic potential of its aqueous extract against standard strains and *E. coli* and *S. aureus* strains from mastitic milk (Mota et al., 2011). Avancini et al. (2016) evaluated the antimicrobial/disinfectant action of the macela hydroalcoholic extract on a standard strain of *Candida albicans* (ATCC 14053) and strains from cases of bovine mastitis. The results showed its potential for use on sources of infection, in disinfection or antisepsis procedures. Studies on the action of macela flavonoids showed that quercetin is able to induce the aggregation of bacterial cells and cause morphological changes in these cells, being highly effective in controlling MRSA strains (Hirai et al., 2010).

In view of the results presented herein, the combination of flaxseed oil and macela extract in the NE-ML1:5 formulation shows significant potential as an antimicrobial against planktonic MRSA. As such, the antibiofilm activity of this formulation was further investigated.

#### ***Antibiofilm activity: Prevention of biofilm formation***

NE-ML1:5 reduced biofilm formation of the *S. aureus* ATCC 25923 and four strains of MRSA from bovine mastitic milk (Table 5). NE-ML1:5 prevented 100% of biofilm formation at a concentration of 10 and 25% (v/v) for strains 534 and 406. The formulation showed a reduction in the mass of biofilm greater than 64% for ATCC 25923 and strains 614 and 204 at a concentration of 25% (v/v). This reduction is proportional to the

number of existing metabolically active cells, as confirmed by the addition of resazurin. Therefore, 25% (v/v) was considered the MBIC, which contains 0.6 mg mL<sup>-1</sup> of macela extract and 12 mg mL<sup>-1</sup> of flaxseed oil. It is important to highlight that the integrity of the biofilm structure in the present study was interrupted for all tested concentrations in three of the four strains and the ATCC. This was most evident at the highest concentrations (10 and 25% v/v). However, NE-ML1:5 did not prevent the formation of biofilm (MBIC) for three of the four strains and for the ATCC 25923 at 5% (v/v).

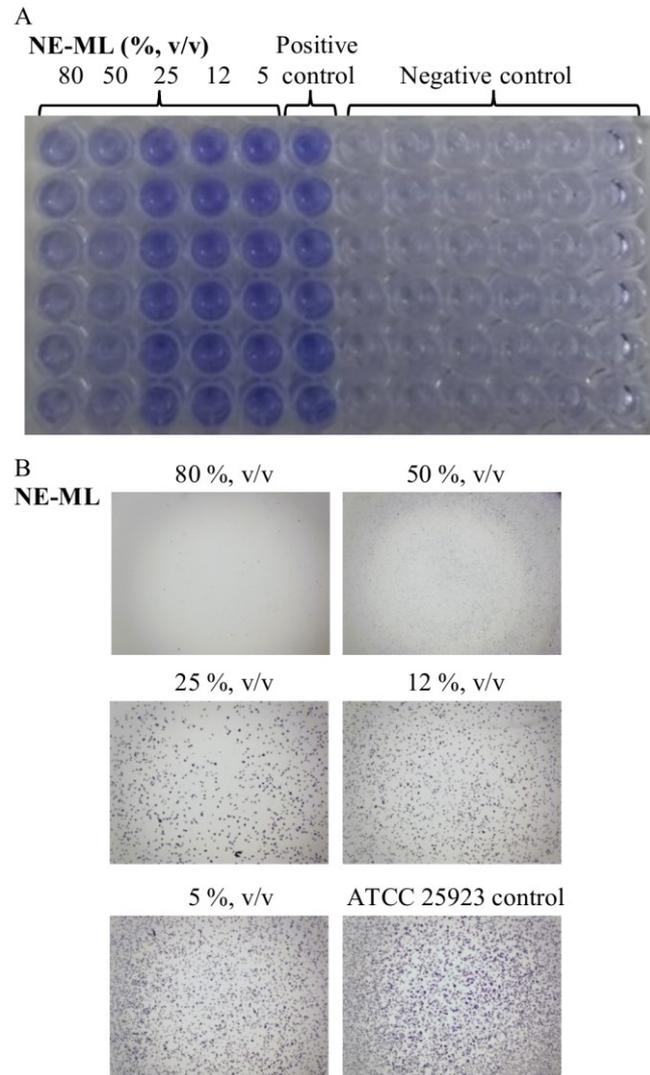
***Antimicrobial activity: Eradication of formed biofilm***

Similarly, this formulation was able to remove biofilm previously formed over 48 h (Table 5).

**Table 5.** Effect of NE-ML1:5 on biofilm formation and eradication of preformed biofilm of *S. aureus* ATCC25923 and MRSA from bovine mastitic milk.

Antibiofilm activity	NE-ML1:5 (%, v/v)	% of biofilm reduction				
		ATCC 25923	strain 614	strain 534	strain 406	strain 204
Prevention of biofilm formation (MBIC)	25	64	70	100	100	95
	10	42	67	100	75	96
	5	0	0	19	0	0
Eradication of formed Biofilm (MBEC)	80	86	90	93	96	73
	50	74	78	87	50	70
	25	47	60	65	38	16
	12	43	32	0	33	14
	5	40	29	0	30	11

Treatment with 80% (v/v) NE-ML1:5 (equivalent to 2 mg mL<sup>-1</sup> of macela extract) for 24 h showed a reduction of more than 73% of the preformed biofilm for all evaluated strains, and it was thus considered the MBEC. It is important to note that we only observed a reduction of about 50%, or more, with concentrations of at least 50% (v/v) for all analyzed strains. Figure 5 shows the effect of NE-ML1:5 on preformed biofilms using the violet crystal dye.



**Figure 5.** (A) Activity of different concentrations of NE-ML1:5 on biofilm preformed for 48 h using violet crystal dye. Positive control: broth + inoculum. Negative control: broth, NE-ML 1:5 + broth and NE-B + broth. Proportions following NE-ML refer to the proportion of Tween 80 and flaxseed oil in the formulation (1:5). (B) Microscopic images of biofilms obtained after treating with 80, 50, 25, 12 and 5% (v/v) NE-ML1:5 and control with inoculum (ATCC 25923) colored with crystal violet.

NE-ML1:5 reduced biofilm formation of *S. aureus* in the context of prevention and eradication, evidencing the potential of this nanoemulsion in the intramammary therapy of bovine mastitis. Previous studies have shown the antibiofilm effect of macela extract on anaerobic bacteria in the oral cavity, causing a significant reduction in these populations (Both and Petrovick, 2016). Resistance to antimicrobial activity may be related to inefficient penetration in the biofilm matrix, which presents a barrier, or to the altered growth rate of

biofilm organisms (Donlan and Costerton, 2002). Cells associated with biofilm grow significantly slower than planktonic cells and, as a result, absorb antimicrobial agents more slowly (Donlan and Costerton, 2002). This fact may be an advantage for the use of nanostructured antimicrobial. In addition to having a smaller particle size, which can favor penetration, nanoemulsions can also release the encapsulated compounds gradually over an extended period of time. In the context of bovine mastitis, *S. aureus* bacteria in mammary tissue are mainly located in clusters within alveoli and lactiferous ducts in association with epithelial cells and in interstitial tissue (Sandasi et al., 2010). The invasion of *S. aureus* into interstitial tissue can help bacteria survive. Therefore, small-sized antimicrobial nanostructures may be excellent candidates for treatments that offer greater penetration power.

The results found in the present study support future *in vivo* assessments of the intramammary use of the developed macela-nanoemulsion. For future, applications *in vivo* studies should be performed in order to determine the effective doses. It is noteworthy that this innovative macela-nanoemulsion represents an alternative sustainable antimicrobial product for control of MRSA. It can also subsidize organic and agroecological milk production systems, which have limited availability of antimicrobial treatments for mastitis.

## **Conclusion**

The developed macela-nanoemulsion (NE-ML) showed potential as an innovative antimicrobial product, in particular, NE-ML1:5 formulation. Future researches should include *in vitro* and *in vivo* studies for evaluation of therapy and control of MRSA infections.

**Acknowledgements:** This study was funded by CNPq (Edital 39/2013, 403415/2013-6). The authors are grateful to Dr. Valquiria L. Bassani and Dr. Sara E. Bianchi from the Galenic Development Laboratory (UFRGS) for the identification of achyrobichalcone in the macela extract and to Central Laboratory of Electron Microscopy (LCME-UFSC).

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest. In addition, the authors declare the availability of the data for publication on Nano Express.

## References

Abebe, R., Hatiya, H., Abera, M., Megersa, B. and Asmare, K., 2016. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, 12(1), p.270.

Acosta, A.C., Silva, L.B.G.D., Medeiros, E.S., Pinheiro-Júnior, J.W. and Mota, R.A., 2016. Mastites em ruminantes no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36(7), pp.565-573.

Adukwu, E.C., Allen, S.C. and Phillips, C.A., 2012. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), pp.1217-1227.

Arredondo, M.F., Blasina, F., Echeverry, C., Morquio, A., Ferreira, M., Abin-Carriquiry, J.A., Lafon, L. and Dajas, F., 2004. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) DC and some of its main flavonoids against oxidative stress. *Journal of ethnopharmacology*, 91(1), pp.13-20.

Avancini, C.A.M., Campos, F.L., Valente, P. and Ethur, E.M., 2016. Disinfectant activity of the crude hydroalcoholic extract of *Achyrocline satureioides* (Asteraceae) on *Candida* spp. isolated in problem-situations of bovine mastitis. *Acta Veterinaria Brasilica*, 10(4), pp.327-333.

Bianchi, S.E., Kaiser, S., Pittol, V., Doneda, E., De Souza, K.C.B. and Bassani, V.L., 2019. Semi-preparative isolation and purification of phenolic compounds from *Achyrocline satureioides* (Lam) DC by high-performance counter-current chromatography. *Phytochemical Analysis*, 30(2), pp.182-192.

Bidone, J., Zorzi, G.K., Carvalho, E.L., Simões, C.M., Koester, L.S., Bassani, V.L. and Teixeira, H.F., 2014. Incorporation of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC extracts into topical nanoemulsions obtained by means of spontaneous emulsification procedure. *Industrial Crops and Products*, 62, pp.421-429.

Bidone, J., Argenta, D.F., Kratz, J., Pettenuzzo, L.F., Horn, A.P., Koester, L.S., Bassani, V.L., Simões, C.M.O. and Teixeira, H.F., 2015. Antiherpes activity and skin/mucosa distribution of flavonoids from *Achyrocline satureioides* extract incorporated into topical nanoemulsions. *BioMed research international*, 2015.

Blasina, M.F., Vaamonde, L., Morquio, A., Echeverry, C., Arredondo, F. and Dajas, F., 2009. Differentiation induced by *Achyrocline satureioides* (Lam) infusion in PC12 cells. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(9), pp.1263-1269.

Both, J.M.C. and Petrovick, P.R., 2016. Atividade desinfetante anti-*Staphylococcus aureus* metilina resistentes e compostos flavonoides em *Achyrocline satureioides* Lam.(macela). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(4).

Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E. and Fessi, H., 2004. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *International journal of pharmaceutics*, 280(1-2), pp.241-251.

Busanello, M., Rossi, R.S., Cassoli, L.D., Pantoja, J.C. and Machado, P.F., 2017. Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds. *Journal of dairy science*, 100(8), pp.6545-6553.

Busato, A., Trachsel, P., Schällibaum, M. and Blum, J.W., 2000. Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. *Preventive veterinary medicine*, 44(3-4), pp.205-220.

Carini, J.P., Kaiser, S., Ortega, G.G. and Bassani, V.L., 2013. Development, optimisation and validation of a stability-indicating HPLC method of achyrobichalcone quantification using experimental designs. *Phytochemical Analysis*, 24(3), pp.193-200.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition*. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. USA, 2003.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests* supplement M100S16, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2006.

Detloff, T., Sobisch, T. and Lerche, D., 2013. Instability index. *Dispersion Letters Technical*, 4, pp.1-4.

Diaz, M.A., Rossi, C.C., Mendonça, V.R., Silva, D.M., Ribon, A.D.O., Aguilar, A.P. and Muñoz, G.D., 2010. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(5), pp.724-728.

Domadia, P., Swarup, S., Bhunia, A., Sivaraman, J. and Dasgupta, D., 2007. Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochemical pharmacology*, 74(6), pp.831-840.

Donlan, R.M. and Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), pp.167-193.

Donsì, F., Annunziata, M., Vincenzi, M. and Ferrari, G., 2012. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. *Journal of biotechnology*, 159(4), pp.342-350.

El-Deeb, K.S., Abbas, F.A., El-Fishawy, A. and Mossa, J.S., 2004. Chemical composition of the essential oil of *Tagetes minuta* growing in Saudi Arabia. *Saudi pharmaceutical journal*, 12(1), pp.51-53.

Fernandes, A.R., Ferreira, N.R., Figueiro, J.F., Santos, A.C., Veiga, F.J., Cabral, C., Silva, A.M. and Souto, E.B., 2017. Ibuprofen nanocrystals developed by 22 factorial design experiment: A new approach for poorly water-soluble drugs. *Saudi pharmaceutical journal*, 25(8), pp.1117-1124.

Fiordalisi, S.A., Honorato, L.A., Loiko, M.R., Avancini, C.A., Veleirinho, M.B., Machado Filho, L.C. and Kuhnen, S., 2016. The effects of Brazilian propolis on etiological agents of

mastitis and the viability of bovine mammary gland explants. *Journal of dairy science*, 99(3), pp.2308-2318.

Gomes, F. and Henriques, M., 2016. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Current microbiology*, 72(4), pp.377-382.

Guimarães, J.L., Brito, M.A., Lange, C.C., Silva, M.R., Ribeiro, J.B., Mendonça, L.C., Mendonça, J.F. and Souza, G.N., 2017. Estimate of the economic impact of mastitis: A case study in a Holstein dairy herd under tropical conditions. *Preventive veterinary medicine*, 142, pp.46-50.

Harwansh, R.K., Deshmukha, R., Rahman, M.A. 2019. Nanoemulsion: Promising nanocarrier system for delivery of herbal bioactives. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, pp. 224-253.

Hashim, A.F., Hamed, S.F., Hamid, H.A.A., Abd-Elsalam, K.A., Golonka, I., Musiał, W. and El-Sherbiny, I.M., 2019. Antioxidant and antibacterial activities of omega-3 rich oils/curcumin nanoemulsions loaded in chitosan and alginate-based microbeads. *International journal of biological macromolecules*, 140, pp.682-696.

Hirai, I., Okuno, M., Katsuma, R., Arita, N., Tachibana, M. and Yamamoto, Y., 2010. Characterisation of anti-Staphylococcus aureus activity of quercetin. *International journal of food science & technology*, 45(6), pp.1250-1254.

Honorato LA, Machado Filho LCP, Barbosa Silveira ID & H"otzel MJ. 2014. Strategies used by dairy family farmers in the south of Brazil to comply with organic regulations. *J Dairy Sci* 97(3): 1319-1327. Holzschuh, M.H., Gosmann, G., Schneider, P.H., Schapoval, E.E.S. and Bassani, V.L., 2010. Identification and stability of a new bichalcone in *Achyrocline satureioides* spray dried powder. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(9), pp.650-656.

Jaiswal, M., Dudhe, R. and Sharma, P.K., 2015. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech*, 5(2), pp.123-127.

Joray, M.B., Palacios, S.M. and Carpinella, M.C., 2013. Understanding the interactions between metabolites isolated from *Achyrocline satureioides* in relation to its antibacterial activity. *Phytomedicine*, 20(3-4), pp.258-261.

Joshi, Y., Garg, R. and Juyal, D., 2014. Evaluation of synergistic antimicrobial activity of Gemifloxacin with *Linum usitatissimum* seed oil. *liver*, 2, p.4.

Kaithwas, G., Mukerjee, A., Kumar, P. and Majumdar, D.K., 2011. *Linum usitatissimum* (linseed/flaxseed) fixed oil: antimicrobial activity and efficacy in bovine mastitis. *Inflammopharmacology*, 19(1), pp.45-52.

Khan, Z.J., Khan, N.A., Naseem, I. and Nami, S.A., 2017. Therapeutics, phytochemistry and pharmacology of *Tukhm-e-Katan* (*Linum usitatissimum* L.). *Int J Adv Pharm Med Bioallied Sci*, 2017, p.111.

Locatelli, C., Cremonesi, P., Caprioli, A., Carfora, V., Ianzano, A., Barberio, A., Morandi, S., Casula, A., Castiglioni, B., Bronzo, V. and Moroni, P., 2017. Occurrence of methicillin-

- resistant *Staphylococcus aureus* in dairy cattle herds, related swine farms, and humans in contact with herds. *Journal of dairy science*, 100(1), pp.608-619.
- Mazzarino, L., da Silva Pitz, H., Lorenzen Voytena, A.P., Dias Trevisan, A.C., Ribeiro-Do-Valle, R.M. and Maraschin, M., 2018. Jaboticaba (*Plinia peruviana*) extract nanoemulsions: development, stability, and in vitro antioxidant activity. *Drug development and industrial pharmacy*, 44(4), pp.643-651.
- Melchior, M.B., Vaarkamp, H. and Fink-Gremmels, J., 2006. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections?. *The Veterinary Journal*, 171(3), pp.398-407.
- Mistry, P.H., Mohapatra, S.K. and Dash, A.K., 2012. Effect of high-pressure homogenization and stabilizers on the physicochemical properties of curcumin-loaded glycerol monooleate/chitosan nanostructures. *Nanomedicine*, 7(12), pp.1863-1876.
- Mohanraj, V.J. and Chen, Y., 2006. Nanoparticles-a review. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 5(1), pp.561-573.
- Mota, F.M., Carvalho, H.H.C., Wiest, J.C., 2011. Atividade antibacteriana in vitro de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. - Asteraceae (“macela”, “marcela”) sobre agentes bacterianos de interesse em alimentos. *Rev Bras Plant Med*, 13, pp. 298-304.
- Mubarack, H.M., Doss, A., Dhanabalan, R. and Venkataswamy, R., 2011. Activity of some selected medicinal plant extracts against bovine mastitis pathogens. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(6), pp.738-741.
- Mushtaq, S., Shah, A.M., Shah, A., Lone, S.A., Hussain, A., Hassan, Q.P. and Ali, M.N., 2018. Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. *Microbial pathogenesis*, 114, pp.357-361.
- O'fallon, J.V., Busboom, J.R., Nelson, M.L. and Gaskins, C.T., 2007. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. *Journal of animal science*, 85(6), pp.1511-1521.
- Ohno, T., Kita, M., Yamaoka, Y., Imamura, S., Yamamoto, T., Mitsufuji, S., Kodama, T., Kashima, K. and Imanishi, J., 2003. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 8(3), pp.207-215.
- Pinheiro Machado, G.T., Veleirinho, M.B., Mazzarino, L., Machado Filho, L.C.P., Maraschin, M., Cerri, R.L.A. and Kuhnen, S., 2019. Development of propolis nanoparticles for the treatment of bovine mastitis: in vitro studies on antimicrobial and cytotoxic activities. *Canadian Journal of Animal Science*, 99(4), pp.713-723.
- Pol, M. and Ruegg, P.L., 2007. Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *Journal of dairy science*, 90(1), pp.249-261.
- Polydoro, M., De Souza, K.C.B., Andrades, M.E., Da Silva, E.G., Bonatto, F., Heydrich, J., Dal-Pizzol, F., Schapoval, E.E.S., Bassani, V.L. and Moreira, J.C.F., 2004. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life sciences*, 74(23), pp.2815-2826.

- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., Hartigan, P., Fanning, S. and Fitzpatrick, E., 2011. *Veterinary microbiology and microbial disease*. John Wiley & Sons.
- Retta, D., Dellacassa, E., Villamil, J., Suárez, S.A. and Bandoni, A.L., 2012. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review. *Industrial Crops and Products*, 38, pp.27-38.
- Rivera, F., Gervaz, E., Sere, C. and Dajas, F., 2004. Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Marcela). *Journal of ethnopharmacology*, 95(2-3), pp.359-362.
- Riviere, J.E., 2007. The future of veterinary therapeutics: A glimpse towards 2030. *The Veterinary Journal*, 174(3), pp.462-471.
- Ruegg, P.L., 2009. Management of mastitis on organic and conventional dairy farms. *Journal of animal science*, 87(suppl\_13), pp.43-55.
- Sabini, M.C., Cariddi, L.N., Escobar, F.M., Mañas, F., Comini, L., Reinoso, E., Sutil, S.B., Acosta, A.C., Montoya, S.N., Contigiani, M.S. and Zanon, S.M., 2013. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *Food and chemical toxicology*, 60, pp.463-470.
- Sandasi, M., Leonard, C.M. and Viljoen, A.M., 2010. The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in applied microbiology*, 50(1), pp.30-35.
- Sarker, S.D., Nahar, L. and Kumarasamy, Y., 2007. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42(4), pp.321-324.
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duijkeren, E., Johnson, A.P. and Gaastra, W., 2010. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(4), pp.601-604.
- Sharma, P.K., Varadan, V.V. and Varadan, V.K., 2003. A critical role of pH in the colloidal synthesis and phase transformation of nano size  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> with high surface area. *Journal of the European Ceramic Society*, 23(5), pp.659-666.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in applied microbiology*, 26(2), pp.118-122.
- Soavi, L., Stellini, R., Signorini, L., Antonini, B., Pedroni, P., Zanetti, L., Milanesi, B., Pantosti, A., Matteelli, A., Pan, A. and Carosi, G., 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398, Italy.
- Spoehr, M., Rau, J., Friedrich, A., Klittich, G., Fetsch, A., Guerra, B., Hammerl, J.A. and Tenhagen, B.A., 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in three dairy herds in southwest Germany. *Zoonoses and Public Health*, 58(4), pp.252-261.

Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., BONAVENTURA, G.D., Djukić, S., Čirković, I. and Ruzicka, F., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), pp.891-899.

Sutradhar, K.B. and Amin, M.L., 2013. Nanoemulsions: increasing possibilities in drug delivery. *European Journal of Nanomedicine*, 5(2), pp.97-110.

Sze, A., Erickson, D., Ren, L. and Li, D., 2003. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow. *Journal of colloid and interface science*, 261(2), pp.402-410.

Troncarelli, M.Z., Brandão, H.M., Gern, J.C., Guimarães, A.S. and Langoni, H., 2013. Nanotechnology and antimicrobials in veterinary medicine. *Badajoz, Spain: FORMATEX*.

Vargas, R.M.F., Barroso, M.S.T., Neto, R.G., Scopel, R., Falcão, M.A., da Silva, C.F. and Cassel, E., 2013. Natural products obtained by subcritical and supercritical fluid extraction from *Achyrocline satureioides* (Lam) DC using CO<sub>2</sub>. *Industrial crops and products*, 50, pp.430-435.

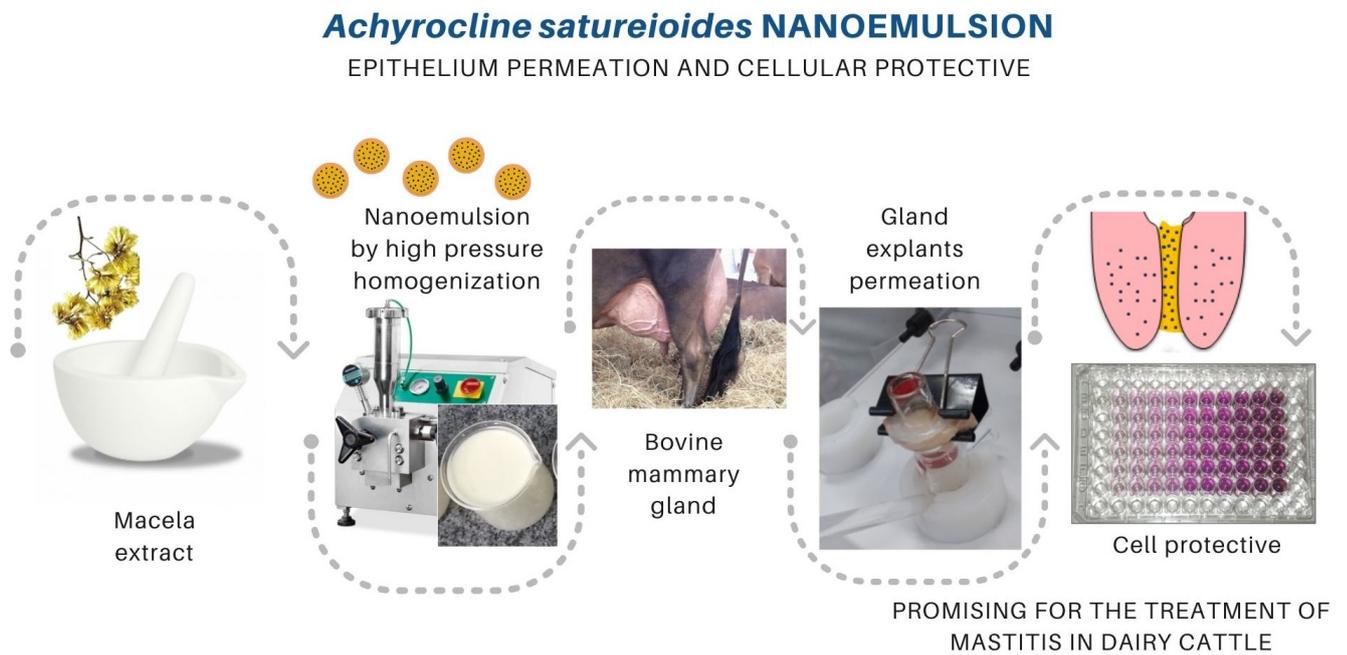
Wu, D., Kong, Y., Han, C., Chen, J., Hu, L., Jiang, H. and Shen, X., 2008. D-Alanine: D-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin. *International journal of antimicrobial agents*, 32(5), pp.421-426.

Yerragunta, V., Suman, D., Anusha, V., Patil, P. and Samhitha, T., 2013. A review on Chalcones and its importance. *PharmaTutor*, 1(2), pp.54-59.

Zielińska, A., Martins-Gomes, C., Ferreira, N.R., Silva, A.M., Nowak, I. and Souto, E.B., 2018. Anti-inflammatory and anti-cancer activity of citral: Optimization of citral-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) using experimental factorial design and LUMiSizer®. *International journal of pharmaceutics*, 553(1-2), pp.428-440.

***Achyroline satureioides* (Lam.) DC. extract-loaded nanoemulsions for treating bovine mastitis: protective properties and polyphenol permeation studies through mammary epithelium**

Artigo em processo de submissão, o qual mostrou o efeito citoprotetor e a maior capacidade de permeação dos compostos fenólicos do extrato de macela (*Achyroline satureioides* Lam. DC.) nanoemulsionado em células epiteliais da glândula mamária bíviva da linhagem MAC-T e em explantes mamários bovinos, respectivamente. Este estudo também demonstrou a capacidade da nanoemulsão de macela em inibir a morte celular apoptótica e necrótica das células MAC-T. Os resultados encontrados sugerem o potencial da nanoemulsão estudada para o tratamento intramamário da mastite bovina.



***Achyroline satureioides* (Lam.) DC. extract-loaded nanoemulsions for treating bovine mastitis: protective properties and polyphenol permeation studies through mammary epithelium**

Gabriela T. Pinheiro Machado<sup>1</sup>, Maria Beatriz Veleirinho<sup>1</sup>, Roberto Gabriel Ferreira<sup>1</sup>, Carine Zuglianello<sup>2</sup>, Elenara Lemos-Senna<sup>2</sup> and Shirley Kuhnen<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Biochemistry and Natural Products Laboratory - LABINAT, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, 88034-001;*

<sup>2</sup>*Pharmaceutical Technology Laboratory, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, 88040-900*

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate innovative sustainable nanoemulsions of flaxseed oil (*Linum usitatissimum*) loaded with macela extract (*Achyrocline satureioides*) candidates for bovine mastitis therapy in terms of their permeation/retention capacity and viability/protective effects. Unloaded (NE-BL) and extract-loaded nanoemulsions (2.5 mg mL<sup>-1</sup>) (NE-ML) (n=4) were prepared using high-pressure homogenization with varying concentrations of flaxseed oil and Tween 80. Permeation and retention of free and nanoencapsulated quercetin, 3-O-methylquercetin and luteolin were performed on mammary glandular epithelium using Franz diffusion cells. The protective effect was evaluated on mammary epithelial cells (MAC-T lineage) by determining the viability using the MTT method (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and necrotic or apoptotic death by flow cytometry after exposure to NE-ML and NE-BL. Subsequently, this effect was assessed by previously treating MAC-T cells with NE-ML and then exposing cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to analyze necrotic or apoptotic death by flow cytometry. Higher permeation of quercetin and 3-O-methylquercetin in NE-ML was found compared to that of free extract with a final permeated amount of 50.7±3.2 and 111.2±0.6 µg/cm<sup>-2</sup> compared to 35.0±0.6 and 48.9±1.2, respectively. For NE-BL, the IC<sub>50</sub> was at least 1.3% (v/v), while for the NE-ML, it was at least 2.6% (v/v). After exposure to NE-ML (5 and 1.2%, v/v), the percentage of apoptotic cells was reduced (± 30%). For the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> test, necrotic cells previously exposed to NE-ML were reduced by 40% (1%, v/v). The reduced toxicity, cytoprotective and increased permeation potential of innovative macela-nanoemulsion make this a promising new candidate for bovine mastitis therapy.

**KEY WORDS:** bovine mastitis, flavonoids, apoptosis, cytoprotection, oxidative stress, quercetin, 3-O-methylquercetin

## INTRODUCTION

*Achyrocline satureioides* (LAM.) DC., Asteraceae, popularly known as macela, is an annual, aromatic herb native to South America commonly found in Brazil's native grasslands and widely used in traditional medicine [1]. The biological activities of macela, such as antimicrobial, cytoprotective, antioxidant, and anti-inflammatory, have been frequently attributed to the abundant flavonoids found in its inflorescences, especially quercetin, luteolin, and 3-O-methylquercetin [1,2]. Owing to its multiple biological activities, the use of macela is attracting interest across a range of research areas, including veterinary sciences [3]. For example, the high antimicrobial activity found in macela extract makes it a promising alternative for the therapy of bovine mastitis [3,4] because treatments require the use of antimicrobials effective against pathogens causing the disease [5]. However, as mastitis is commonly treated through the intramammary application of antimicrobials, it is important to evaluate the possible toxic effects of the therapy on epithelial cells [6]. Damage to these cells may induce not only the formation of connective tissue in the affected area, with associated interalveolar fibrosis of the mammary tissue, loss of secretory function, and alteration in the quantity and quality of the milk produced, but also cause proinflammatory effects, which can worsen the clinical condition of the animal [3,7].

In this context, the low levels of toxicity attributed to macela compounds are of interest and corroborate the traditional use of this plant [8]. Along with low toxicity, the cytoprotective capacity of macela compounds, especially 3-O-methylquercetin, provides the characteristics necessary for intramammary application [2,9]. Equally important is the evaluation of the penetration capacity of active compounds through the mammary glandular epithelium. Antimicrobials with low penetration/permeation power may spread inadequately throughout the mammary gland, impeding the effects on all affected areas. This may contribute to the frequent recurrence of cases of mastitis, which can become chronic through the application of ineffective treatments. Furthermore, *Staphylococcus aureus*, a bacterium often isolated from bovine mastitis, is associated with the ability to form biofilms as a survival strategy. This ability hinders the effects of antimicrobials unable to penetrate the biofilm matrix [10]. Nanoemulsion systems are, however, recognized as promoting the permeation of compounds across biological membranes by the reduced size of the droplets, fluidity, and capacity of interaction with the epithelium [11]. Considering the antimicrobial potential and evidence of low cytotoxicity of macela [2-4], along with the greater penetration power of nanoemulsified systems, the present study aimed to evaluate *in vitro* effects of innovative

sustainable nanoemulsions of flaxseed oil (*Linum usitatissimum*) loaded with macela extract (*Achyrocline satureioides*) on the viability and protection of mammary epithelial cells of the MAC-T lineage. The ability of the nanoemulsions to promote the permeation of flavonoid compounds through the mammary glandular epithelium was also evaluated considering its potential use in the therapy of bovine mastitis, especially in organic and agroecological systems of dairy production, systems that have limited availability by legislation of permitted and effective treatments.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Macela samples and extract preparation**

Commercial samples of macela were acquired from “*Entre Ervas*”, a company in southern Brazil that produces aromatic and medicinal herbs (30°02'14.89"S/51°12'39.08"W). Macela extract was prepared by macerating inflorescences with 80% ethanol (v/v) (1:60, w/v) for 10 min. The extracts were then vacuum filtered and the organic solvent removed with a rotary evaporator at 60°C. Immediately after solvent removal, the aqueous phase of the extract (20 mL) was used to prepare the nanoemulsions.

### **Preparation of nanoemulsions of flaxseed oil loaded with macela extract (NE-ML)**

Nanoemulsions loaded with macela extract (NE-ML) and their respective blank-nanoemulsions (NE-BL), i.e., without extract, were prepared according to Pinheiro Machado et al. [4]. To obtain NE-ML, the macela extractive solution, equivalent to 250 mg of extract, was slowly poured into an oily phase consisting of different concentrations of flaxseed oil (1, 5, and 10%, w/v) and Tween 80 surfactant (0.2, 1, and 5%, w/v). Table 1 shows the preparation conditions of the different formulations.

### **Determination of macela phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC/DAD)**

Analysis of the phenolic composition of the macela extract was performed by HPLC/DAD, using a Thermo Scientific UltiMate 3000 RS Dual System (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) with a Thermo Scientific C18 reverse-phase column (4.6 x 150 mm; 5 µm; 120Å; Acclaim™, Thermo Scientific®) at 25°C, operating at 240, 270, 320 and 375 nm. The mobile phase consisted of Milli-Q® water acidified to pH 2.3 (A) and methanol (B) eluted at

a flow of 1.0 mL/min using the following gradient program: 0-5 min, 90% A; 5-25 min, 30% A; 25-37 min, 90%A. The identification of quercetin, 3-O-methylquercetin, and luteolin was performed by comparison with retention times of the commercial standards obtained from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil, Q4951) according to a previously developed method [4] that has shown to be specific, precise and linear for quercetin assay (range of 0.97–1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $r^2 > 0.999$ ,  $y = 0.168x$ ). The detection limit (DL) was 0.19  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , whereas the quantification limit (QL) was 0.63  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . To the standard deviation of the response ( $\sigma$ ), the  $y$ -intercepts obtained from three calibration curves were considered, and to  $S$ , the slope of the mean calibration curve was considered. For the glandular epithelium permeation and retention experiments, the specificity of the method was determined by analyzing the neat extract of the glandular epithelium at the same conditions in triplicate. The intra-day precision was assessed by six determinations at the test concentration (established at 4.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , corresponding to 27.8  $\mu\text{g/cm}^2$  of the membrane for retention experiments), and it was repeated on another day to assess the inter-day precision. These values were reported as relative standard deviation (RSD) between determinations. The accuracy, in terms of percent of recovery of an amount of analyte added in the sample, was assessed by nine determinations at three concentration levels (3.5; 7.0 and 14.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### **Cytotoxicity assay**

Bovine epithelial cells of the MAC-T (mammary alveolar cells -T) lineage from the Cell Bank of Rio de Janeiro (BCRJ) were maintained in culture. Briefly, MAC-T cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and supplemented with 100 U/ml of penicillin, 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of streptomycin, 20% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco, CA, USA), 4 mM L-glutamine (Synth), 4.5 g/L glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1 mM of sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1.5 g/L sodium bicarbonate (Vetec™ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  insulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  hydrocortisone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 37°C and 5%  $\text{CO}_2$  in a humidified incubator. The medium was changed every 48 h. When the cells reached 70% confluence, they were treated with 0.25% trypsin in 1 mM EDTA to prepare the cellular suspension ( $10^5$  cells/mL). The suspension was plated in a 96-well microplate (100  $\mu\text{L/well}$ ), followed by incubation (24 h) in culture conditions for adherence. Subsequently, varying concentrations (10 to 0.3%, v/v) of NE-MLs and their respective NE-BLs were added for 24 h, and cytotoxicity was determined

based on the MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; 0.5 mg/mL) method. Flaxseed oil and free macela extract were also evaluated in concentrations ranging from 4000 to 12  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The formed formazan was dissolved with dimethyl sulfoxide (DMSO) to give a purple color with characteristic absorption at 540 nm. Intensity of purple color is directly proportional to the number of viable cells, thus indicating cell viability. Cells cultivated in untreated DMEM were considered 100% viable. The experiments were performed in triplicate.

### **Annexin V staining and flow cytometric analysis**

Annexin V coupled with FITC is typically used in conjunction with propidium iodide (PI) to identify different stages of apoptotic and necrotic cells using flow cytometry. MAC-T cells, after treatment with different concentrations of NE-ML1:5 and NE-BL1:5 formulations at 0.6, 1.2, and 5% (v/v) for 23 h, were added to  $\text{H}_2\text{O}_2$  at 2 mM. Subsequently, trypsinization and labeling with annexin V and PI were performed following the manufacturer's instructions (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Briefly, the washed cells were resuspended in 10  $\mu\text{L}$  of binding buffer containing Annexin V-FITC (BD Biosciences, San Diego, CA) and incubated in the dark for 25 min. Then, another 10  $\mu\text{L}$  of binding buffer containing PI were added and incubated for a further 10 min. Apoptotic cells were identified using a FACSCalibur™ BD flow cytometer and counted in the upper and lower right quadrants, including the percentages of both early (annexin V-positive) and late apoptotic cells (annexin V- and PI-positive). Normal cells were counted in the lower left quadrant (annexin V- and PI-negative), and necrotic cells were counted in the upper left quadrant (PI-positive). Two independent assays were performed according to [12] with modifications.

### ***In vitro* mammary glandular epithelial permeation and retention analysis**

Permeation and retention studies of flavonoid compounds found in macela extract were performed using Franz diffusion cells with an effective diffusion area of 1.58  $\text{cm}^2$ . Epithelium from the internal part of the mammary gland was used as a membrane model in this study, aiming for the intramammary treatment of bovine mastitis. Mammary explants of dry cows intended for disposal were obtained from a local meat processor (Águas Mornas, Brazil) immediately after slaughter. Later they were cleaned with ultrapure water, packed in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), and stored at 10°C until processing. The epithelial glandular tissue was detached from the explants and inserted between the donor and receptor

compartments of Franz cells with the apical side facing up. The receptor chamber was filled with 50% hydroethanolic solution (11.0 mL) in order to maintain sink conditions [13,14]. The receptor medium was maintained under magnetic stirring at 37°C during the experiments. To assess permeation, 1 mL of NE-ML1:5, or the aqueous extract of macela containing 77  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of quercetin, 188  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of 3-O-methylquercetin, and 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of luteolin, was added to the donor compartment. Aliquots of receptor medium (1.0 mL) were collected and immediately replaced at predetermined times (0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 h) to assess the compounds of interest. The same volume of fresh receptor medium was immediately restored to the cells to maintain sink conditions. After 12 h of the experiment, the excess formulation was removed from the donor compartment with a piece of cotton. Tissue slices were then removed from the Franz cells and fragmented for quantification of the compounds retained in the epithelium. The compounds of interest were extracted from the fragments with methanol (2.0 mL), using an ultrasound probe for 2 min followed by an ultrasound bath for 10 min. The samples were filtered through regenerated cellulose membranes of 0.45  $\mu\text{m}$  and analyzed by HPLC/DAD, as described above. From the results, curves of quantity permeated ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) over time (h) were constructed, and the steady-state flow (J), lag time (Tlag) and permeability coefficient (Kp) were determined. The steady-state flow (J) was obtained by the angular coefficient of the straight line that relates permeate quantity ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) as a function of time. The lag time (Tlag) (time necessary for the constant passage of the substance through the membrane in conditions of infinite dosage) was determined by extrapolating the steady-state line in the abscissa axis of the graph of permeate quantity and time ( $y = 0$ ) [15,16]. The Kp (permeability coefficient in cm/h) was obtained as  $K_p = J/C$ , where J is the flow (in  $\mu\text{g/cmh}^{-1}$ ), and C is the concentration of the flavonoids in the donor solution (in  $\mu\text{g/cm}^3$ ). The retention results were expressed as the average amount of retained flavonoids per area of the membrane ( $\mu\text{g/cm}^2$ ). The experiments were replicated six times.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test for the cytotoxicity and cytoprotection assays, and two-way ANOVA, followed by a Holm-Sidak and *t*-test for the tissue permeation and retention experiments, using GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).  $\text{IC}_{50}$  values were determined using nonlinear regression. Values of  $P < 0.05$  were considered significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

The macela-nanoemulsion used in the present study represents a potential and innovative antimicrobial product developed by our research group in a previous study [4]. To ensure safety in studies of its *in vivo* evaluation for microbial control of bovine mastitis, we believe that studies of its *in vitro* cytotoxicity and penetration are an equally important preliminary step. Therefore, the present study focused on supporting future studies of the use of macela-nanoemulsion by intramammary route as a safe and innovative delivery system of herbal bioactives.

### Chemical characterization of macela extract

Three major flavonoids, 3-O-methylquercetin, quercetin, and luteolin, were identified *via* HPLC in the macela extract in concentrations of  $187.3 \pm 0.1$ ,  $76.3 \pm 0.1$  and  $30.4 \pm 0.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. These flavonoids, which occur in macela inflorescences, are recognized as providing the biological activities of the plant, such as antimicrobial, cytoprotective, antioxidant, and anti-inflammatory [1,2].

### Characterization of nanoemulsions

The parameters obtained from macela-nanoemulsion (NE-ML) assessment are the same as those evaluated in a previous study by Pinheiro Machado et al. [4] on the development of formulations where the antimicrobial potential was also tested. Briefly, all nanoemulsions were homogeneous without precipitate formation or phase separation. The NE-ML formulations presented a milky aspect with a yellowish coloration from the addition of macela extract. The blank-nanoemulsions (NE-BL) had a milky appearance with white color. The mean particle size, polydispersity index, zeta potential and pH of the nanoemulsions are shown in Table 1.

**Table 1.** Composition and physicochemical characteristics of nanoemulsions with flaxseed oil and macela extract developed by high-pressure homogenization (HPH).

<b>Variables</b>	<b>NE-BL0.2:1</b>	<b>NE-BL1:5</b>	<b>NE-BL5:5</b>	<b>NE-BL5:10</b>
Tween 80 (% w/v)	0.2	1	5	5
Flaxseed oil (% w/v)	1	5	5	10
Extractive macela solution (% v/v) *	-	-	-	-
Water (q.s. to) (mL)	100	100	100	100
Size (nm)	251.4±6.0	227.0±3.6	212.8±2.5	187.7±3.5
PdI	0.19±0.0	0.19±0.0	0.21±0.0	0.23±0.0
Zeta potential (mV)	-37.6±1.8	-30.6±0.9	-27.1±1.2	-26.1±1.7
pH	4.7±0.2	4.9±0.2	5.1±0.1	5.2±0.1
<b>Variables</b>	<b>NE-ML0.2:1</b>	<b>NE- ML1:5</b>	<b>NE-ML5:5</b>	<b>NE- ML5:10</b>
Tween 80 (% w/v)	0.2	1	5	5
Flaxseed oil (% w/v)	1	5	5	10
Extractive macela solution (% v/v) *	20	20	20	20
Water (q.s. to) (mL)	100	100	100	100
Size (nm)	229.8±4.8	249.9±2.6	222.3±2.0	203.9±2.7
PdI	0.19±0.0	0.17±0.0	0.18±0.0	0.23±0.0
Zeta potential (mV)	-40.3±1.0	-39.9±2.7	-38.6±2.5	-34.5±0.9
pH	4.8±0.0	5.1±0.0	4.6±0.0	4.7±0.0

\* In the final composition of the macela nanoemulsions (NE-ML), the extract content corresponded to 2.5 mg mL<sup>-1</sup>. Proportions following NE-B and NE-ML refer to the concentration of Tween 80 and flaxseed oil in the formulations.

The encapsulation efficiency of quercetin, 3-O-methylquercetin, and luteolin was over 94%. More detail on formulation development can be found in the study described by Pinheiro Machado [4].

### Cytotoxicity in MAC-T cells

The viability of MAC-T cells was affected by exposure to NE-BLs at all tested concentrations. Similarly, the viability of MAC-T cells was also affected by exposure to the NE-ML formulations (Table 2).

**Table 2.** Percentage of viable bovine epithelial cells from the MAC-T lineage (mean  $\pm$  SEM) after exposure to different concentrations of macela-nanoemulsions (NE-ML) and blank-nanoemulsions (NE-BL).

Concentration (%) (v/v)	Control	NE-BL0.2:1	NE-BL1:5	NE-BL5:5	NE-BL5:10
10	100 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	47.4 $\pm$ 4.0 <sup>bA</sup>	6.2 $\pm$ 1.4 <sup>bB</sup>	6.3 $\pm$ 1.4 <sup>bB</sup>	6.2 $\pm$ 2.9 <sup>bB</sup>
5	100 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	53.5 $\pm$ 4.7 <sup>bA</sup>	14.7 $\pm$ 6.4 <sup>bB</sup>	9.1 $\pm$ 3.0 <sup>bB</sup>	11.3 $\pm$ 1.7 <sup>bB</sup>
1.3	100 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	61.9 $\pm$ 5.4 <sup>bA</sup>	44.6 $\pm$ 5.0 <sup>bB</sup>	82.5 $\pm$ 4.3 <sup>bC</sup>	73.0 $\pm$ 2.3 <sup>bAC</sup>
0.6	100 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	73.3 $\pm$ 4.5 <sup>bAB</sup>	79.2 $\pm$ 1.4 <sup>bB</sup>	86.1 $\pm$ 5.4 <sup>bB</sup>	70.9 $\pm$ 0.5 <sup>bA</sup>
0.3	100 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	80.2 $\pm$ 3.0 <sup>bA</sup>	90.7 $\pm$ 4.8 <sup>aA</sup>	94.2 $\pm$ 8.7 <sup>aA</sup>	69.7 $\pm$ 0.7 <sup>bB</sup>
	Control	NE-ML0.2:1	NE-ML1:5	NE-ML5:5	NE-ML5:10
10	100 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	52.9 $\pm$ 5.2 <sup>bA</sup>	10.1 $\pm$ 0.4 <sup>bB</sup>	8.6 $\pm$ 3.2 <sup>bB</sup>	7.1 $\pm$ 0.8 <sup>bB</sup>
5	100 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	61.4 $\pm$ 9.1 <sup>bA</sup>	57.0 $\pm$ 6.8 <sup>bA</sup>	10.2 $\pm$ 5.1 <sup>bB</sup>	18.1 $\pm$ 10.1 <sup>bB</sup>
1.3	100 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	82.6 $\pm$ 3.5 <sup>bA</sup>	85.8 $\pm$ 2.3 <sup>aA</sup>	88.1 $\pm$ 10.7 <sup>aA</sup>	87.8 $\pm$ 2.4 <sup>aA</sup>
0.6	100 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	86.4 $\pm$ 1.9 <sup>aA</sup>	93.9 $\pm$ 1.4 <sup>aAB</sup>	93.0 $\pm$ 17.0 <sup>aAB</sup>	97.6 $\pm$ 2.5 <sup>aB</sup>
0.3	100 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	91.9 $\pm$ 6.6 <sup>aA</sup>	94.3 $\pm$ 1.3 <sup>aA</sup>	100.0 $\pm$ 10.1 <sup>aA</sup>	98.7 $\pm$ 1.0 <sup>aA</sup>

The results shown are the average of three independent experiments. Different lowercase letters in the same row indicate significant statistical difference between treatments and control. Different uppercase letters in the same row indicate statistically significant difference between treatments ( $P < 0.05$ ).

For NE-BL, a 50% reduction in cell viability was found at 1.3% (v/v), while for NE-ML this reduction only occurred from 2.6% (v/v) (Table 3). Among the tested formulations, NE-ML0.2:1 and NE-ML1:5 differed from the others, as 50% reduction in cell viability was found from concentrations of 9 and 4% (v/v), which represents concentrations 2 to 3.4 times higher, respectively, than their corresponding NE-BL (Table 3).

**Table 3.** Inhibitory concentration (%\*) (v/v) of blank-nanoemulsion (NE-BL) and macela-nanoemulsion (NE-ML) capable of reducing the cellular viability of MAC-T lineage cells by 50%.

IC <sub>50</sub> NE-BL			
NE-BL0.2:1	NE-BL1:5	NE-BL5:5	NE-BL5:10
5.3 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.0	3.1 $\pm$ 0.0	1.4 $\pm$ 0.0
IC <sub>50</sub> NE-ML			
NE-ML0.2:1	NE-ML1:5	NE-ML5:5	NE-ML5:10
9.7 $\pm$ 0.0	4.4 $\pm$ 0.0	2.6 $\pm$ 0.0	2.8 $\pm$ 0.0

Results expressed as an average  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* For NE-ML, the IC<sub>50</sub> values found of 9.7, 4.4, 2.6 and 2.8 are equivalent to 242, 110, 65 and 70  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively, of macela extract in nanoemulsions.

These results suggest the cytoprotective effect of formulations containing macela extract (NE-ML) compared to their respective blank-nanoemulsions (NE-BL). The potential

cytoprotective effect of macela infusions is well documented in the literature [2,17]. In PC12 cells, for example, the cytoprotective activity found *in vitro* was attributed to the rich mixture of potent flavonoids of this plant extract [2].

Compared to NE-BL nanoemulsions, flaxseed oil was generally more toxic to MAC-T cells (Tables 3 and 4). On the other hand, similar results were found when comparing the cell viability of free macela extract to NE-ML (Tables 3 and 4).

**Table 4.** Average percentage of viable MAC-T cells after exposure to different concentrations of macela extract, flaxseed oil, and the control.

Concentration (mg/mL)	Control	Flaxseed oil	Macela extract
4	100 ± 0.0 <sup>a</sup>	33.6 ± 4.5 <sup>bA</sup>	0.0 ± 0.3 <sup>cB</sup>
2	100 ± 0.1 <sup>a</sup>	78.8 ± 4.2 <sup>bA</sup>	0.0 ± 0.3 <sup>cB</sup>
1	100 ± 0.0 <sup>a</sup>	87.0 ± 2.1 <sup>bA</sup>	0.0 ± 0.2 <sup>cB</sup>
0.7	100 ± 0.0 <sup>a</sup>	88.0 ± 2.8 <sup>bA</sup>	9.3 ± 0.3 <sup>cB</sup>
0.3	100 ± 0.2 <sup>a</sup>	93.6 ± 4.2 <sup>aA</sup>	26.8 ± 1.7 <sup>cB</sup>
0.1	100 ± 0.3 <sup>a</sup>	94.0 ± 4.9 <sup>aA</sup>	44.0 ± 2.2 <sup>bB</sup>
0.09	100 ± 0.2 <sup>a</sup>	100 ± 0.5 <sup>aA</sup>	58.3 ± 4.0 <sup>bB</sup>
0.04	100 ± 0.1 <sup>a</sup>	100 ± 0.2 <sup>aA</sup>	78.3 ± 4.1 <sup>bB</sup>
0.02	100 ± 0.0 <sup>a</sup>	100 ± 0.6 <sup>aA</sup>	93.0 ± 3.6 <sup>aA</sup>
0.01	100 ± 0.1 <sup>a</sup>	100 ± 0.0 <sup>aA</sup>	99.3 ± 4.2 <sup>aA</sup>

The results shown are the average of three independent experiments. Different lowercase letters in the same row indicate significant statistical difference between treatments and control. Different uppercase letters in the same row indicate statistically significant difference between treatments ( $P < 0.05$ ).

For free flaxseed oil, the inhibitory concentration capable of reducing cell viability by 50% ( $IC_{50}$ ) was 3.8 mg mL<sup>-1</sup>. On the other hand, when nanoemulsified (NE-BL), the  $IC_{50}$  values varied from 50 to 150 mg mL<sup>-1</sup> (values corresponding to flaxseed oil concentration in nanoemulsion formulations; Table 1). Of the analyzed formulations, NE-BL1:5 showed higher levels of toxicity with an  $IC_{50}$  of 1.3% (v/v), which corresponds to approximately 50 mg mL<sup>-1</sup> of flaxseed oil in the formulation. Macela nanoemulsions did not significantly change the  $IC_{50}$  value, especially for the NE-ML0.2:1 and NE-ML1:5 formulations. While the  $IC_{50}$  of the extract was 0.14 mg mL<sup>-1</sup>, in nanoemulsions, it ranged from 2.6 to 9.7 %, equivalent to 0.07 and 0.24 mg mL<sup>-1</sup> of macela extract in nanoemulsions. The maintenance of cellular viability may be related to the high encapsulation efficiency found for these nanoemulsions (>94%) [4], and low toxicity level may be attributed to macela compounds [8]. In the study that developed these formulations, the authors suggest that the high

encapsulation efficiency values for flavonoids of macela extract are likely related to their affinity to flaxseed oil or the surfactant used in the formulation [4]. The cytotoxic potential of macela was previously investigated by other authors, and the results are inconclusive [3,17,19]. In the study by Polydoro et al. [19], for example, extracts prepared using a different method to that reported herein proved to be highly toxic owing to the distinct capacity to extract flavonoids. On the other hand, Sabini et al. [17] showed that popularly administered concentrations of macela can be used safely, as no cytotoxic or genotoxic effects were found *in vitro*, with values of IC<sub>50</sub> over 1000 µg mL<sup>-1</sup>. Similarly, in another study, a reduced level of toxicity was found for nanoparticles of macela essential oil [18]. Studies of this nature are extremely important as, in some cases, an increase in the effects of a certain nanoencapsulated drug can be associated with an increased toxicological profile, for example, in tumor cells.

However, for the current study, the increased antimicrobial activity of innovative formulations containing macela extract [4] should be associated with reduced toxicity to bovine mammary gland cells. The antimicrobial evaluation of these nanoemulsions was previously investigated against microbial strains of mastitic milk [4], showing a minimum inhibitory concentration value (MIC) that was lower than the IC<sub>50</sub> found in the present study. In this context, when comparing our results with those for antimicrobial activity, the potential of these formulations is clear, particularly for NE-ML1:5. In the previous study, this formulation showed a MIC<sub>50</sub> value of 1.2% (v/v) against methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) bacteria strains from mastitic milk, i.e., almost four times less than the IC<sub>50</sub> found herein (4.4%, v/v). Such results suggest promising potential for this formulation for analysis in future *in vivo* studies. When in contact with the NE-ML1:5 nanoemulsion, it should be noted that cell viability greater than 90% was observed in MAC-T cells at the concentration capable of inhibiting microbial growth (MIC<sub>50</sub> 1.2%, v/v), which corresponds to 30 µg mL<sup>-1</sup> of dry macela extract [4]. Moreover, the NE-ML1:5 formulation highlighted in the previous forced stability analysis showed a lower instability index than the others [4]. Therefore, the remaining analyses performed in the current study were conducted using the NE-ML1:5 formulation.

### **Apoptosis and necrosis induction**

After exposure to NE-ML1:5, an analysis of the type of cellular death induction revealed a reduction in the percentage of cell apoptosis compared to the NE-BL1:5 formulation at all tested concentrations (5, 1.2 and 0.6%; v/v). For example, approximately twice as many

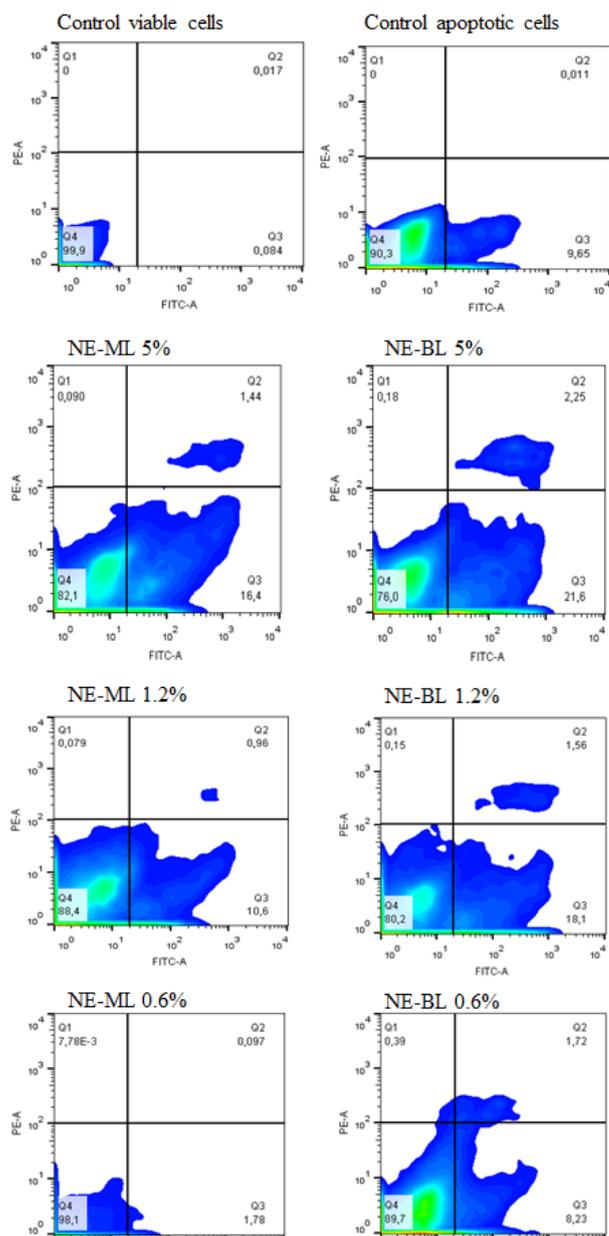
apoptotic cells were found after exposure to the highest concentration of the NE-BL1:5 formulation (5%, v/v) (Table 5). For all tested concentrations (5, 1.2 and 0.6%, v/v), cell viability of > 75% was observed (Table 5). However, after exposure to NE-ML, a higher percentage of viable cells were found at concentrations of 5 and 1.2% compared to NE-BL (Table 5). In addition, after exposure to these same concentrations, a lower percentage of apoptotic cells were found.

**Table 5.** Percentage of viable MAC-T cells in early apoptosis, late apoptosis, and early + late apoptosis after exposure to different concentrations of macela-nanoemulsion (NE-ML1:5) and blank-nanoemulsion (NE-BL1:5).

Formulation	Concentration (%) (v/v)	Initial Apoptosis	Late Apoptosis	Initial+Late Apoptosis	Viable Cells
NE-BL	5	24.4 ± 2.6 <sup>a</sup>	2.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	26.7 ± 2.7 <sup>a</sup>	74.9 ± 2.7 <sup>a</sup>
NE-ML	5	15.5 ± 0.7 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.0 <sup>a</sup>	16.8 ± 0.7 <sup>b</sup>	82.4 ± 0.9 <sup>b</sup>
NE-BL	1.2	14.0 ± 1.5 <sup>a</sup>	1.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	15.8 ± 1.5 <sup>a</sup>	83.9 ± 1.5 <sup>a</sup>
NE-ML	1.2	8.87 ± 0.5 <sup>b</sup>	1.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	9.9 ± 0.6 <sup>b</sup>	89.8 ± 0.6 <sup>b</sup>
NE-BL	0.6	7.4 ± 0.6 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	8.4 ± 0.7 <sup>a</sup>	91.2 ± 0.7 <sup>a</sup>
NE-ML	0.6	1.54 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	94.5 ± 1.7 <sup>a</sup>

Values expressed as an average ± SEM of experiments performed in triplicate. Different lowercase letters in the column represent significant pairwise differences between NE-BL and NE-ML1:5 for each of the tested concentrations (P < 0.05).

The MTT test corroborated these results in that it showed the cytoprotective potential of macela-nanoemulsion (Table 3). Since exposure of MAC-T cells to the macela-nanoemulsion (NE-ML1:5) resulted in a reduction in the percentage of apoptotic cells compared to the respective blank-nanoemulsion (NE-BL1:5), we can suggest that macela extract may be involved in triggering a possible mechanism of apoptosis inhibition, thus conferring cytoprotection. It is important to note that no cells marked with propidium iodide, i.e., necrotic cells, were found as a result of losing plasma membrane integrity after exposure to both formulations. Even at the highest concentration (5%, v/v), the type of cell death induced by both formulations was predominantly apoptotic (Figure 1).



**Figure 1.** Graphical representation of the percentage of normal (lower left quadrant), initial apoptotic (lower right quadrant), late apoptotic (upper right quadrant), and necrotic (upper left quadrant) cells after exposure to different concentrations of the nanoemulsion NE-ML1:5 and NE-BL1:5.

Previous studies have already suggested the induction of anti-apoptotic mechanisms with macela extract, which is also related to its cytoprotective potential in that flavonoids of this plant have been able to prevent cellular death after oxidative stress [2,17]. In the present study, the maintenance of cellular viability and the anti-apoptotic effects presented by the macela extract formulation (NE-ML1:5) represent an important advantage in the therapy of bovine mastitis, as cytoprotective effects would be triggered. In this context, the results

suggest promising potential for this formulation which will inform studies on its intramammary use for the therapy of bovine mastitis.

Subsequently, we evaluated the type of cell death after prior treatment of MAC-T cells with NE-ML1:5 (1%, v/v), followed by exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2mM) for 1 h (Table 6). In this case, initial apoptosis increased in the exposed cells pretreated with NE-ML1:5, but no reduction in the percentage of cells in apoptosis (initial + late) was observed. A significant reduction in necrotic cells was seen (Table 6), along with an increase in viable cells, when exposed to the pretreatment, again suggesting the cytoprotective effect of NE-ML1:5 on MAC-T cells in terms of necrotic death. This result may be related to the fact that damaged cells are being induced to die by apoptosis owing to the presence of macela extract.

**Table 6.** Percentage of MAC-T cells in early apoptosis, late apoptosis, early + late apoptosis, and necrosis after exposure to macela-nanoemulsion (NE-ML1:5) for 23 h, followed by exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2mM) for 1 h.

<b>Treatment</b>	<b>Initial apoptosis</b>	<b>Late apoptosis</b>	<b>Initial + late apoptosis</b>	<b>Necrosis</b>	<b>Viable cells</b>
NE-ML 1% (v/v)	4.1 ± 0.7 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.5 <sup>b</sup>	5.4 ± 1.1 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>c</sup>	94.3 ± 0.8 <sup>a</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2Mm	6.8 ± 0.7 <sup>b</sup>	18.1 ± 4.8 <sup>a</sup>	25.0 ± 5.4 <sup>a</sup>	32.9 ± 2.8 <sup>a</sup>	42.1 ± 2.6 <sup>c</sup>
NE-ML1% (v/v)+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2mM	13.3 ± 3.5 <sup>a</sup>	15.3 ± 4.1 <sup>a</sup>	28.7 ± 6.6 <sup>a</sup>	13.3 ± 3.9 <sup>b</sup>	57.2 ± 6.6 <sup>b</sup>

Values expressed as an average ± SEM of experiments performed in triplicate. Different lowercase letters in the column represent significant differences between treatments (P < 0.05).

Since macela is popularly used for its cytoprotective potential, previous research has assessed such effects [2,20]. However, a previous study showed that the cytoprotective potential of macela is dependent on the concentration of flavonoids present in the extract [2]. In that study, exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, along with the infusion of macela (75 or 100 µg mL<sup>-1</sup>), resulted in significant cytoprotection when compared to PC12 cells treated only with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. On the other hand, 5 to 50 µg mL<sup>-1</sup> of the infusion of this plant showed no cytoprotective activity [2].

The cytoprotective effect of macela infusions (10 or 20 µg mL<sup>-1</sup>) and their isolated compounds (quercetin and luteolin) was also previously investigated using the capacity to

induce cellular differentiation [21]. The objective of the study was to evaluate the differentiation capacity in PC12 cells exposed to an infusion of *A. saturoioides* and some of its isolated flavonoids. The best results were found for the macela infusion that was capable of inducing cellular differentiation in PC12 cells [21].

The cytoprotective potential of macela has been attributed to the high content of flavonoids found in this plant in which aglycones could be the main components responsible for the cytoprotective activity [2]. The same authors showed that two free flavonoids present in the plant (quercetin and luteolin) had cytoprotective activity when added to cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

In the context of the present study, the apoptotic cell death of MAC-T cells may call for further research since *S. aureus*, a bacterium that causes mastitis, presents intracellular survival capacity as a protective mechanism against the effects of the host immune system, as well as the effects of antimicrobials [22-24]. Thus, the programmed death of some infected cells could release the pathogen, which would make it more susceptible to the effects of the body's defense cells, thus supporting greater treatment efficacy and the preservation of mammary gland health. Results similar to those of the present study are described in the literature, showing that a progressive increase > 3 μM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at the cellular level led to the necrotic cell death of Jurkat T cells [25]. The same authors highlight that cellular responses to oxidative stress range from survival, damage repair and improvement of cellular antioxidant defenses to apoptotic or necrotic cell senescence and death.

This possible association with the type of cellular death is important information in the evaluation of a product's potential for the intramammary therapy of mastitis, as necrotic cell death can aggravate the clinical condition of the animal by the triggering of pro-inflammatory cytokines and chemokines.

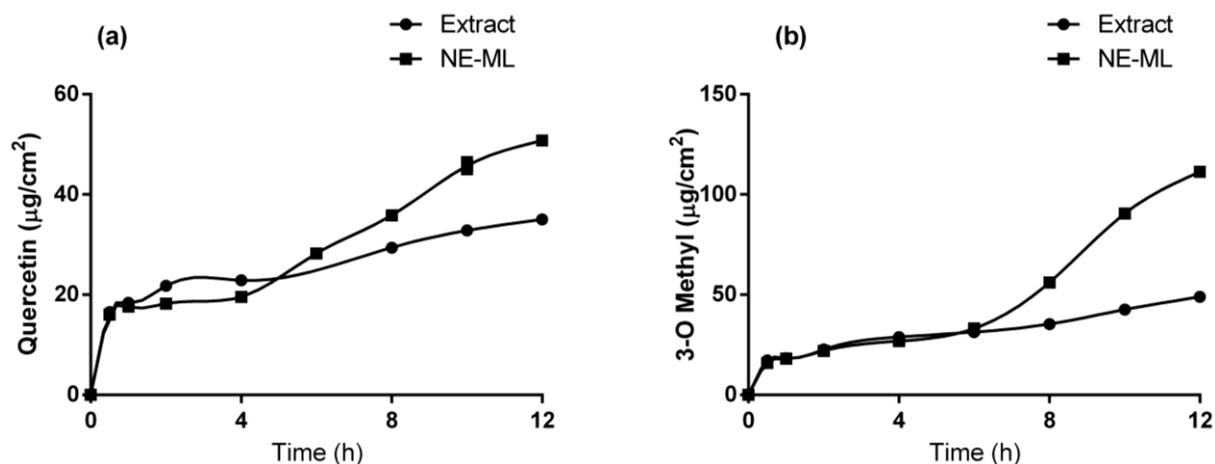
### ***In vitro* mammary glandular epithelial permeation and retention studies**

Interest in *in vitro* permeation studies have been directed to assess the transport of drugs through different biological barriers, such as skin and buccal, nasal, and ocular mucosa, as a way to predict the performance of innovative dosage forms in the formulation development stages [26]. Such studies are carried out using diffusion cells, such as Franz cells, which are constituted of two compartments, a donor chamber where samples are applied and a receptor

chamber containing the receptor medium which has the temperature controlled *via* the water jacket ports using a bath circulation apparatus. Between the two chambers, a slice of the biological membrane is placed, and after applying the sample to be tested, aliquots of the receptor medium are withdrawn at different times and analyzed using a validated analytical method to determine the permeated drug concentration [27]. In the present study, the permeation and retention capacity of flavonoid compounds of macela through mammary glandular epithelium was performed using Franz diffusion cells. The mammary gland is composed of connective tissue, which can be fibrous or adipose [28,29]. The bovine teat canal is an invagination of the skin, lined by stratified squamous epithelium, with keratinized superficial strata. The *stratum corneum* is sloughed during milking and continually regenerated. The keratin prevents milk leakage and bacterial entry and acts as a sealant between milkings and during the dry period. The epithelial tissue from the internal part of the mammary gland was used as a membrane model in this study [29]. To date, no publications have been identified that use epithelium from the internal section of the bovine mammary gland with diffusion cells. To maintain sink conditions during the experiment, a hydroethanolic medium was chosen on the basis of literature reports [13,14] and the dose of flavonoids in relation to the volume of the receptor chambers.

The results obtained by the HPLC/DAD method were not influenced by the matrix compounds. No peak for the neat extract of the glandular epithelium was observed in the chromatograms at the retention time of the analytes at tested conditions. The method showed intra- and inter-day precision (RSD), respectively, of 2.7% and 2.3% and recovery of  $103.0 \pm 7.1\%$ ,  $97.0 \pm 1.3\%$  and  $105.0 \pm 4.3\%$  from the smallest to the highest level tested (respectively 3.5; 7.5 and  $14.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

The cumulative permeation profiles of the chemical markers of macela extract, *i.e.*, quercetin and 3-O-methylquercetin, after application of NE-ML1:5 nanoemulsion and macela extract to the mammary gland explants can be seen in Figure 2.



**Figure 2.** Cumulative permeation profiles of quercetin and 3-O-methylquercetin after application of nanoemulsion and macela extract to the mammary glandular epithelium.

The results of the permeated and retained amounts of the compounds quercetin, 3-O-methylquercetin, and luteolin after 12 h can be seen in Table 7.

**Table 7.** Amounts of flavonoids quercetin, 3-O-methylquercetin, and luteolin permeated and retained by area ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) in mammary glandular epithelium over 12 h.

Flavonoid	Vehicle	Permeated ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Retained ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
Quercetin	Extract	$35.0 \pm 0.2^b$	$12.7 \pm 0.8^a$
	NE-ML1:5	$50.7 \pm 1.6^a$	$6.3 \pm 0.3^b$
3-O-methylquercetin	Extract	$48.9 \pm 1.2^b$	$8.6 \pm 0.3^b$
	NE-ML1:5	$111.2 \pm 0.3^a$	$14.6 \pm 1.0^a$
Luteolin	Extract	n.d. <sup>a</sup>	$5.0 \pm 0.3^a$
	NE-ML1:5	n.d. <sup>a</sup>	$3.9 \pm 0.2^a$

n.d.: not detected in samples as a result of concentrations below the detection/quantification limit of the method. Values expressed as an average  $\pm$  SD. Different lowercase letters in the column represent significant pairwise differences ( $P < 0.05$ ).

Considering the analysis of chemical markers of this extract, luteolin could not be quantified in the receptor medium because it was at concentrations below the detection limit of the method of analysis. It is important to note that the permeation profiles of quercetin and 3-O-methylquercetin were similar after initial application of the nanoemulsion and the extract to the explant. After 6 h of testing, the permeation rate of the flavonoids from the free extract was slower, when compared with the permeation profile obtained for the nanoemulsion. In part, this result can be attributed to the ability of the nanoemulsion to protect flavonoids

from degradation caused by external factors, such as light, oxygen, and temperature [30,31]. In this case, the protection conferred by the nanoemulsion may have enabled a gradual release and permeation of active compounds over time. Also, similar to skin and other epithelial mucosa, the nanoemulsion components, *i.e.* oil and surfactants, can act as permeation enhancers by interacting with the mammary glandular epithelium, increasing flavonoid permeability. The flow parameters (J) and permeability coefficient of quercetin and 3-O-methylquercetin were calculated from the inclination of the apparent linear portion of the cumulative permeation curves, including only data obtained at times greater than the Tlag (Table 8).

**Table 8.** Lag time (Tlag), steady state flow (J), and permeability coefficient (Kp) obtained for quercetin and 3-O-Methylquercetin in a permeation experiment on bovine mammary gland explants.

	<b>Tlag (h)</b>	<b>J (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}</math>)</b>	<b>Kp (cm/h)</b>
Quercetin/Extract	n.a.	$3.4 \pm 1.2^a$	$4.7 \times 10^{-2} \pm 5.4 \times 10^{-4}^a$
Quercetin/NE-ML	3	$4.6 \pm 0.2^b$	$6.0 \times 10^{-2} \pm 2.5 \times 10^{-3}^b$
3-O-Methyl/Extract	n.a.	$4.5 \pm 0.1^a$	$2.4 \times 10^{-2} \pm 3.0 \times 10^{-4}^a$
3-O-Methyl/NE-ML	6	$8.3 \pm 0.2^b$	$4.4 \times 10^{-2} \pm 1.4 \times 10^{-3}^b$

n.a.: not applicable. Values expressed as an average  $\pm$  SD. Different lowercase letters in the column represent significant pairwise differences ( $P < 0.05$ ).

As can be observed, both the flow (J) and the permeability coefficient (Kp) differed when quercetin and 3-O-methylquercetin in the nanoemulsion was compared to the extract ( $P < 0.05$ ).

On the other hand, it is possible to observe that both permeated and retained total amounts were affected after the association of flavonoid compounds with the macela-nanoemulsion (NE-ML1:5). At the end of the experiments, the amount of quercetin and 3-O-methylquercetin retained in the mammary explants was approximately two times greater for the extract ( $12.7$  and  $14.6 \mu\text{g cm}^{-2}$ , respectively) compared to the nanoemulsion ( $6.3$  and  $8.6 \mu\text{g cm}^{-2}$ , respectively), while the amount of luteolin retained was not affected. In contrast, NE-ML1:5 significantly increased the amount of permeated quercetin and 3-O-methylquercetin in relation to the extract with permeate amounts of  $50.7$  and  $111.2 \mu\text{g cm}^{-2}$ , compared to  $35.0$  and  $48.9 \mu\text{g cm}^{-2}$ , respectively ( $P < 0.05$ ). These results are likely related to the ability of nanoemulsions to promote the permeation of active compounds through

biological barriers, which has been widely described in skin permeation studies [26-28]; however, this is the first time the result has been reported for bovine mammary explants.

In light of these results and considering the therapy of bovine mastitis, the intramammary application of NE-ML1:5 nanoemulsion would allow for greater permeation and spread of the active compounds beyond the gland cistern, possibly reaching ducts and alveoli and ensuring greater performance in terms of antimicrobial potential. It is important to highlight that *S. aureus* is a particularly virulent bacterial cause of bovine mastitis that is difficult to control based on its ability to survive in cells and form abscesses and biofilms that protect it from the effects of antimicrobials and the host's immune system [22-24]. Therefore, an antimicrobial with greater penetration capacity is relevant for therapeutic treatments of the disease. According to Radostits [7], the most successful antimicrobial agent for the treatment of mastitis during the dry period is one that persists longer in the udder, preferably more than eight weeks. These characteristics depend on the release time and transport agent in the formulation, as well as the size of the particles and the capacity of diffusion of the antimicrobial through lipophilic biological membranes.

In this context, the cytoprotective potential of the NE-ML1:5 formulation, as a consequence of the higher  $IC_{50}$  and capacity to inhibit cell apoptosis and necrosis, along with the maintenance of cell integrity at values above 82%, shows that this formulation has promising potential as an innovative sustainable product. The need for future *in vivo* studies to evaluate the intramammary use of the formulation for the treatment of bovine mastitis is clear, especially in dry cow therapy.

## CONCLUSION

The macela-nanoemulsion (NE-ML) extract showed reduced toxicity to mammary epithelial cells, inhibition of apoptotic and necrotic cell death, as well as cytoprotective potential. Higher permeation capacity of phenolics through mammary glandular epithelium was also found for the nanoemulsion. The results suggest the potential use of this formulation, particularly NE-ML1:5 (1% Tween, 5% linseed oil and 2.5 mg/mL of macela extract), in the intramammary therapy of bovine mastitis. Macela-nanoemulsion represents a product with potential for application in organic and agroecological systems of dairy production.

**Acknowledgements:** This study was funded by CNPq (Edital 39/2013, 403415/2013-6). The authors thank the LMBV (Laboratory of Plant Morphogenesis and Biochemistry, UFSC) and LAMEB (Multi-User Laboratory of Studies in Biology, UFSC).

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

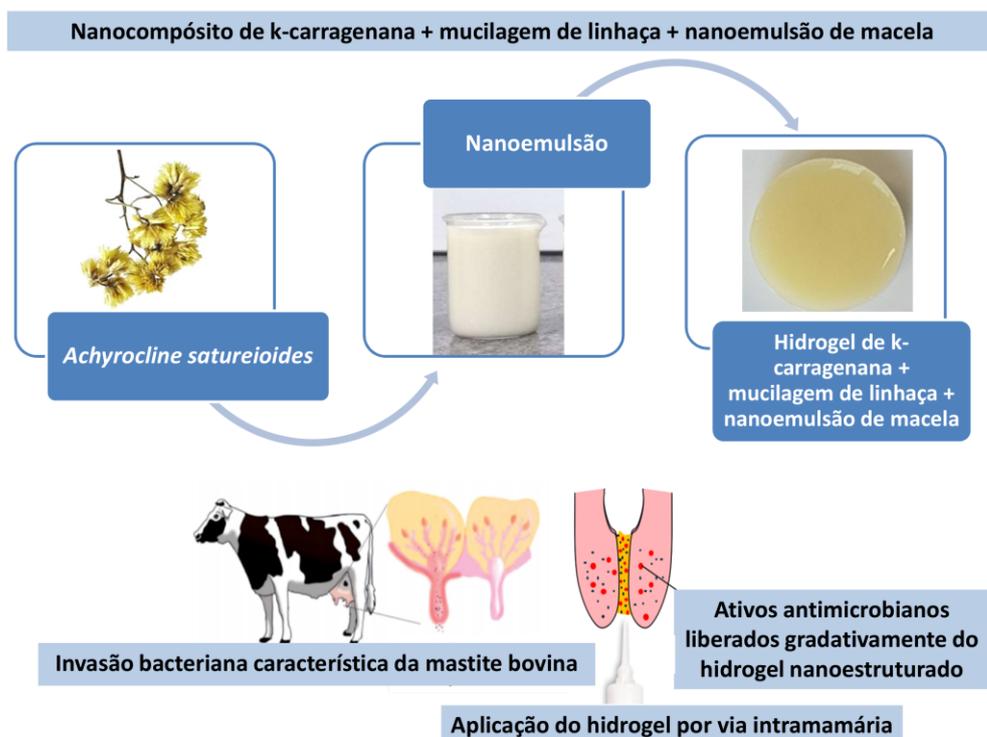
- [1] Retta D, Dellacassa E, Villamil J, et al. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review. *Industrial Crops and Products*. 2012;38:27-38.
- [2] Arredondo MF, Blasina F, Echeverry C, et al. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) DC and some of its main flavonoids against oxidative stress. *J. of ethnopharmacology*. 2004;91(1):13-20.
- [3] Fiordalisi SAL. Potencial de produtos naturais no controle da mastite bovina: teor de fenólicos e flavonoides, atividade antimicrobiana e efeitos sobre as células epiteliais mamárias bovina, [Dissertation]. Florianópolis (SC): Federal University of Santa Catarina; 2018.
- [4] Pinheiro Machado et al. 2020. Formulation and evaluation of anti-MRSA nanoemulsion loaded with *Achyrocline satureioides*: a new sustainable strategy for the bovine mastitis. *Nano Ex*. <https://doi.org/10.1088/2632-959X/abbcac>.
- [5] Langoni H, Salina A, Oliveira GC, et al. Considerations on the treatment of mastitis. / Considerações sobre o tratamento das mastites. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2017;37:1261–1269.
- [6] Kalayou S, Haileselassie M, Gebre-egziabher G, et al. In-vitro antimicrobial activity screening of some ethnoveterinary medicinal plants traditionally used against mastitis, wound and gastrointestinal tract complication in Tigray Region, Ethiopia. *Asian Pacific J. of Tropical Biomedicine*. 2012;2(7):516-522.
- [7] Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, et al. *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. Philadelphia (PA): Elsevier Saunders; 2007.
- [8] Salgueiro AC, Folmer V, da Rosa HS, et al. In vitro and in silico antioxidant and toxicological activities of *Achyrocline satureioides*. *J. of ethnopharmacology*. 2016;194:6-14.
- [9] Kumar AN, Bevara GB, Kaja LK, et al. Protective effect of 3-O-methyl quercetin and kaempferol from *Semecarpus anacardium* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced cytotoxicity in lung and liver cells. *BMC complementary and alternative medicine*. 2016;16(1):1-13.
- [10] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*. 2002;15(2):167-193.

- [11] Rai VK, Mishra N, Yadav KS, et al. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *J. of controlled release*. 2018;270:203-225.
- [12] Craciunescu O, Constantin D, Gaspar A, et al. Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts. *Chemistry Central J*. 2012;6(1):97.
- [13] Fasolo D, Bassani VL, Teixeira, HF. Development of topical nanoemulsions containing quercetin and 3-O-methylquercetin. *Die Pharmazie-An International J. of Pharmaceutical Sciences*. 2009;64(11):726-730.
- [14] Zorzi GK, Caregnato F, Moreira JCF, et al. Antioxidant effect of nanoemulsions containing extract of *Achyrocline satureioides* (Lam) DC—Asteraceae. *AAPS PharmSciTech*. 2016;17(4):844-850.
- [15] Mashru RC, Sutariya VB, Sankalia MG, et al. Effect of pH on in vitro permeation of ondansetron hydrochloride across porcine buccal mucosa. *Pharmaceutical development and technology*. 2005;10(2):241-247.
- [16] Barry BW. Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Advanced drug delivery reviews*. 2002;54:S31-S40.
- [17] Sabini MC, Cariddi LN, Escobar FM, et al. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *Food and chemical toxicology*. 2013;60:463-470.
- [18] Do Carmo GM, Baldissera MD, Vaucher RA, et al. Effect of the treatment with *Achyrocline satureioides* (free and nanocapsules essential oil) and diminazene aceturate on hematological and biochemical parameters in rats infected by *Trypanosoma evansi*. *Experimental parasitology*. 2015;149:39-46.
- [19] Polydoro M, De Souza KCB, Andrades ME, et al. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life sciences*. 2004;74(23):2815-2826.
- [20] Lorenzi HE, Matos FJ. *Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002. p. 512.
- [21] Blasina MF, Vaamonde L, Morquio A, et al. Differentiation induced by *Achyrocline satureioides* (Lam) infusion in PC12 cells. *Phytotherapy Research: An International J. Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2009;23(9):1263-1269.
- [22] Erskine RJ, Wagner S, DeGraves FJ. Mastitis therapy and pharmacology. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 2003;19(1):109-38.
- [23] Gruet P, Maincent P, Berthelot X, et al. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced drug delivery reviews*. 2001;50(3):245-259.

- [24] Hébert A, Sayasith K, Sénéchal S, et al. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS microbiology letters*. 2000;193(1):57-62.
- [25] Schroeter H, Boyd C, Spencer JP, et al. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiology of aging*. 2002;23(5):861-880.
- [26] Franken, A, Eloff, F. C, Du Plessis, J, et al. In vitro permeation of metals through human skin: a review and recommendations. *Chemical research in toxicology*. 2015; 28(12), 2237-2249.
- [27] Friend, D. R. In vitro skin permeation techniques. *Journal of controlled release*. 1992; 18(3), 235-248.
- [28] Klein, B. G. *Cunningham tratado de fisiologia veterinária*. Elsevier Brasil, 2015.
- [29] Paulrud CO. Basic concepts of the bovine teat canal. *Veterinary research communications*. 2005 Apr 1;29(3):215-45.
- [30] Troncarelli MZ, Brandão HM, Gern JC, et al. *Nanotechnology and antimicrobials in veterinary medicine*. Badajoz, Spain: FORMATEX. 2013.
- [31] Harwansh, Ranjit K.; Deshmukh, Rohitas; Rahman, Md Akhlaquer. Nanoemulsion: Promising nanocarrier system for delivery of herbal bioactives. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 51, p. 224-233, 2019

**Nanocompósitos de mucilagem de linhaça e k-carragenana carregados com nanoemulsão de *Achyrocline satureioides*: um antimicrobiano de liberação gradual candidato para o tratamento de mastite bovina**

Artigo em processo de submissão. Neste estudo, hidrogéis de k-carragenana e mucilagem de linhaça foram desenvolvidos para servirem de veículos da nanoemulsão de macela (*Achyrocline satureioides*), i.e., nanocompósitos (NCs). Os materiais desenvolvidos apresentaram características termorreversíveis, condições de gel e viscosidade similar em temperatura de 25°C ( $\pm 1500$  cP). Os NCs mostraram perfil de liberação dos fenólicos totais gradativo e sustentado. Foram eficazes no controle de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA), conferindo liberação prolongada dos ativos antimicrobianos da nanoemulsão incorporada. Os nanocompósitos representaram uma forma farmacêutica antimicrobiana sustentável e inovadora com possibilidade de uso na terapêutica intramamária da mastite bovina no período seco.



**Nanocompósitos de mucilagem de linhaça e k-carragenana carregados com nanoemulsão de *Achyrocline satureioides*: um antimicrobiano de liberação gradual candidato para o tratamento de mastite bovina**

Gabriela Tasso Pinheiro Machado<sup>a</sup>, Roberto Gabriel Ferreira<sup>a</sup>, Maria Beatriz Veleirinho<sup>a</sup>, Luciana Aparecida Honorato<sup>a</sup>, Roberta de Oliveira Ramos<sup>b</sup>, Marcos Antônio Segatto Silva<sup>b</sup> and Shirley Kuhnen<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Bioquímica e Produtos Naturais - LABINAT, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brasil, 88034-001;

<sup>b</sup> Laboratório de Controle de Qualidade - LABCQ, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brasil, 88040-900;

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento e a otimização das propriedades físico-químicas de um hidrogel antimicrobiano a base de mucilagem de linhaça e k-carragenana carregado com nanoemulsão-macela para a liberação gradativa dos ativos da nanoemulsão incorporada, i.e., nanocompósito, candidato à terapêutica intramamária da mastite bovina. A fim de otimizar as propriedades físico-químicas, i.e., viscosidade, velocidade de degradação e liberação dos ativos, os nanocompósitos (NCs) foram desenvolvidos nas proporções de 8:2, 7:3 e 5:5 (m/m) de k-carragenana/mucilagem de linhaça, respectivamente, com 1,25 mg de extrato de macela/g de gel. Os NCs foram analisados com foco nos perfis de liberação dos compostos ativos da nanoemulsão de macela e nas propriedades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (SARM). Os NCs apresentaram características termorreversíveis, sendo líquidos em temperatura de 60°C e em condições de gel em temperatura de 25°C. A viscosidade foi similar entre os NCs em 40°C ( $\pm 1500$  cP). Entre 25 e 30°C o NC-5:5 apresentou menor viscosidade (5100 cP). Os três NCs mostraram perfil de liberação dos fenólicos totais gradativo atingindo aproximadamente 80% (m/v) em 72 h. O NC-5:5 mostrou liberação de fenólicos totais inicial (entre 2 e 4 h) mais rápida, com pico máximo de liberação em 24 h enquanto para os NCs 7:3 e 8:2 ocorreu apenas com 48 h. Os NCs 5:5, 7:3 e 8:2 mostraram pico de liberação da 3-O-metilquercetina (3-O-MQ) e da achyrobichalcona (ACB) em 72 h. A liberação da 3-O-MQ ao longo de 72 h mostrou-se mais lenta e gradual em comparação à ACB, atingindo 50% (m/v) de liberação próximo das 24 h. A ACB dos três NCs liberou-se mais rapidamente, atingindo valores próximos de 50% (m/v) em 2 h. Os três NCs inibiram o crescimento de SARM (ATCC 33592) até 8 h de incubação. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) de 312  $\mu\text{g/mL}$  de extrato de macela foram encontradas para o NC-5:5 e de 625  $\mu\text{g/mL}$  para o NC-8:2 e NC-7:3. Não foram encontrados efeitos tóxicos dos compósitos hidrogéis não carregados com a nanoemulsão de macela (UNCs) sobre cultivo *in vitro* de células epiteliais da glândula mamária bovina (MAC-T). Os NCs desenvolvidos representam uma forma farmacêutica antimicrobiana de liberação prolongada, sustentável e inovadora, com viscosidade adequada para sua futura avaliação na terapêutica intramamária da mastite bovina, especialmente em sistemas sustentáveis de produção leiteira, i.e., orgânico e agroecológico.

**Palavras-chaves:** Mastite, Hidrogel Antimicrobiano, Nanocompósito, Mucilagem de Linhaça, *Achyrocline satureioides*.

## Introdução

Os polímeros naturais são materiais biodegradáveis, biocompatíveis, renováveis, menos tóxicos e mais baratos, capazes de reduzir diversos problemas biológicos e ecológicos decorrentes do uso de polímeros sintéticos (Distantina et al., 2013; Khalil et al., 2017). Dentre os diversos polímeros naturais, compósitos hidrogéis desenvolvidos a base de k-carragenana e mucilagem de linhaça vêm sendo investigados devido às suas propriedades reológicas e capacidade de formação de gel termorreversível (Chen et al., 2006).

A k-carragenana é um mucopolissacarídeo extraído das paredes celulares da alga tropical *Kappaphycus alvarezii* (Campo et al., 2009) e tem sido empregado na fabricação de novos materiais com potencial de aplicação em diversos sistemas de administração de fármacos (Khalil et al., 2017; Muhamad et al., 2019). Elevada atividade antimicrobiana tem sido encontrada, por exemplo, pela incorporação de extratos de plantas, extratos de sementes e óleos essenciais em compósitos de carragenana (Kanmani, 2014; Shojaee et al., 2014a; Shojaee et al., 2014b). A mucilagem de linhaça, por sua vez, é um hidrocolóide de polissacarídeos neutros que se forma em torno das sementes após embebição (Esau, 1977; Frey-Wyssling, 1976; Naran et al., 2008), com boa capacidade de retenção de água, devido à sua acentuada capacidade de dilatação e alta viscosidade em solução aquosa (Chen et al., 2004; Fedeniuk & Biliaderis, 1994). Esta possui fraca capacidade de gelificação, entre 2- 2,5% (m/m) (Chen et al., 2004; Chen et al., 2006). Os compósitos podem ser obtidos através da combinação de diferentes polímeros pela simples mistura de materiais (Khalil et al., 2017). Deste modo, o uso desses polímeros em formulações farmacêuticas vem sendo mais frequentemente investigado para o desenvolvimento de compósitos como veículos de liberação de ativos, mostrando um perfil de liberação gradual (Hasnain et al., 2018) e alto potencial antimicrobiano (Haseeb et al., 2016).

De forma inovadora, tem se estudado o desenvolvimento de compósitos nos quais pelo menos um dos componentes possui dimensões nanométricas, i.e. nanocompósitos (Khalil et al., 2017). Nanocompósitos (NCs) apresentam algumas

vantagens em termos de propriedades mecânicas e de barreira, liberação controlada de fármacos e eficiência de adsorção (Algharib et al., 2020; Khalil et al., 2017). Os NCs têm sido considerados importantes sistemas de transporte de fármacos de forma intracelular por mostrarem melhor penetração em locais doentes devido ao tamanho de partícula reduzido dos ativos encapsulados (Algharib et al., 2020). Na terapêutica da mastite bovina, um exemplo pode ser encontrado no estudo que desenvolveu um gel de uso tópico a base de carbopol e nanopartículas de cobre com comprovada ação antimicrobiana contra *S. aureus* e *Escherichia coli* (Krishna et al., 2017). Nesse contexto, o desenvolvimento de nanocompósitos para a liberação gradual de ativos antimicrobianos naturais nanoemulsionados pode ser de interesse visando a sua aplicação intramamária na terapêutica da mastite bovina.

Em um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, uma nanoemulsão de macela foi desenvolvida, tendo mostrado elevada atividade antimicrobiana e antibiofilme *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* metilina resistente isoladas de leite mastítico (Pinheiro Machado et al., 2020a). Entretanto, para uso intramamário no período improdutivo, é de interesse a adequação da viscosidade desta nanoemulsão através da sua incorporação em veículos de liberação lenta, permitindo um tempo de ação mais prolongado. Dessa forma, o desenvolvimento de um nanocompósito antimicrobiano obtido da mistura dos polímeros k-carragenana e mucilagem de linhaça carregados com a nanoemulsão de *Achyrocline satureioides* (nanoemulsão de macela) pode representar estratégia inovadora para uso intramamário, especialmente para os sistemas sustentáveis de produção leiteira, i.e., orgânico e agroecológico.

A mastite bovina, doença de alta prevalência em rebanhos bovinos leiteiros (Guimarães et al., 2017), tem apresentado maiores taxas de cura de infecções estafilocócicas (25-75%) pelo uso de antimicrobianos intramamários no intervalo entre lactações, o chamado período seco (Langoni et al., 2017; Quinn et al., 2005). Neste tipo de terapia, além da longa duração é desejado o uso de antimicrobianos formulados em veículo que permita boa retenção dentro da glândula, que tenha alto peso molecular, que apresente alta taxa de difusão através do tecido mamário, que não cause irritação e que tenha estabilidade em relação à atividade antimicrobiana (Radostits et al., 2007; Spinosa et al., 2011). Apesar das maiores taxas de cura apresentadas pela TVS, faltam opções terapêuticas que possam ser usados pelos sistemas orgânicos e agroecológicos. A

mudança do sistema de produção leiteira e a demanda comercial por alimentos de qualidade biológica superior, como o leite orgânico, estão em expansão em todo o mundo (Sahota, 2009).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento e a otimização físico-química de um hidrogel antimicrobiano a base de mucilagem de linhaça e k-carragenana carregado com nanoemulsão-macela para a liberação gradativa dos ativos da nanoemulsão incorporada, i.e., nanocompósito. Maior ênfase foi dada à viscosidade, velocidade de degradação e liberação da nanoemulsão-macela, visando atender à demanda dos sistemas sustentáveis de produção leiteira, i.e., orgânico e agroecológico em termos de tratamento intramamário da mastite bovina.

## **Materiais e Métodos**

### **Preparo do extrato e da nanoemulsão de macela**

Amostras comerciais de macela foram adquiridas da “Entre Ervas”, empresa que produz ervas medicinais aromáticas e orgânicas no sul do Brasil (30 ° 02'14,89"S / 51 ° 12'39,08"W). O extrato de Macela foi preparado macerando inflorescências com etanol 80% (v/v) (1:60, p/v) por 10 min. Os extratos foram então filtrados a vácuo e o solvente orgânico removido em um evaporador rotativo a 60°C. Imediatamente após a remoção do solvente, a fase aquosa do extrato (20 mL) foi utilizada para preparar as nanoemulsões. Para a obtenção da nanoemulsão de macela, utilizamos o método descrito por Pinheiro Machado et al. (2020a). As características físico-químicas da nanoemulsão de macela NE-ML1:5 são descritas em Pinheiro Machado et al. (2020a).

### **Mucilagem de linhaça**

As sementes de linhaça dourada (*Linum usitatissimum* L.; Jasmine Alimentos Ltda.) na proporção 2:10 (m/v) foram adicionadas à 100 mL de água destilada, seguido de aquecimento à 100 °C por 20 minutos. A mistura foi então filtrada em malha de nylon (1 mm) para a separação da mucilagem (Ziolkowska, 2012, com modificações).

## K-carragenana

A carragenana Kappa foi adquirida da Sigma-Aldrich (K-carrageenan, 22048; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO).

### Desenvolvimento dos hidrogéis a base de mucilagem de linhaça e k-carragenana carregado com nanoemulsão-macela (nanocompósitos- NCs)

Com o objetivo de produzir um novo material com as características físico-químicas otimizadas, i.e., viscosidade, velocidade de degradação e liberação dos ativos os NCs foram produzidos por gelificação de diferentes proporções das soluções poliméricas, carragenana Kappa e mucilagem de linhaça. A k-carragenana (2%, m/v) foi preparada a partir da dissolução do polímero em água destilada e na nanoemulsão de macela em recipientes distintos. Ambas foram agitadas até a completa solubilização do polímero à 60° C (~20 min). Testes prévios de exposição da nanoemulsão de macela a altas temperaturas mostraram que a formulação permaneceu estável quando aquecida à 60°C considerando tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta (dados não mostrados). A dissolução dos polímeros foi realizada em recipientes com tampa para evitar evaporação do solvente durante o aquecimento. Para a formação dos NCs, a k-carragenana e mucilagem de linhaça líquidas preparadas previamente foram pesadas e imediatamente misturadas em diferentes proporções (Tabela 1). Após a mistura, os polímeros foram mantidos em banho maria sob agitação por cerca de 1 min até a sua completa homogeneização. Dos sete compósitos inicialmente avaliados, três foram selecionados para a realização dos ensaios posteriores (Tabela 1).

**Tabela 1.** Nanocompósitos (NCs) desenvolvidos com diferentes proporções de k-carragenana e mucilagem de linhaça (m/m).

Composição (m/m)	k-carragenana	NC-9:1	NC-8:2	NC-7:3	NC-6:4	NC-5:5	Mucilagem de linhaça
k-carragenana (g) <sup>1</sup>	10	5	5	5	5	5	-
k-carragenana (g) <sup>2</sup>	-	4	3	2	1	-	-
Mucilagem de linhaça (g)	-	1	2	3	4	5	10

(1) K-carragenana preparada na macela-nanoemulsão (2,5 mg/mL de extrato de macela); (2) k-carragenana preparada em água destilada.

## **Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

A espectroscopia de infravermelho (FTIR) foi realizada em um PerkinElmer Spectrum One equipado com um acessório de amostragem ATR universal. Os espectros de IR foram registrados na faixa de frequência de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  usando 16 varreduras por ciclo de amostra. Os dados foram analisados usando o software Spectrum (PerkinElmer Spectrum™ 10). Para esta análise, o extrato de macela e os materiais desenvolvidos foram liofilizados.

## **Comportamento viscosimétrico do hidrogel a base de mucilagem de linhaça e k-carragenana carregado com nanoemulsão-macela (nanocompósitos- NCs)**

Os NCs foram caracterizados quanto à viscosidade em reômetro Brookfield DV-II+Pro utilizando o spindle LV4. A análise consistiu em avaliar a variação da viscosidade em função da temperatura, com o objetivo de verificar o comportamento de gelificação dos materiais NC-5:5, NC-7:3 e NC-8:2. Imediatamente após o preparo, as medições da viscosidade foram realizadas partindo da temperatura de preparo (60°C) até as temperaturas de interesse, i.e., 40, 30 e 25 °C, as quais são próximas da temperatura corporal do animal e da temperatura ambiente. A velocidade utilizada em todos os experimentos foi 60 rpm. Após a estabilização da temperatura de interesse com o material no compartimento da amostra, o equipamento foi programado para realizar cinco medições de viscosidade, com intervalo de 10 s entre cada medida. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  SD para cada temperatura avaliada.

## **Estudo de liberação do hidrogel a base de mucilagem de linhaça e k-carragenana carregado com nanoemulsão-macela (nanocompósitos -NCs)**

A cinética de liberação controlada dos compostos ativos encapsulados e livres da nanoemulsão de macela dos NCs foi realizada *in vitro* em sistema Dubinoff simulando as condições fisiológicas. Para isso, amostras (3 g) de cada NC e seus respectivos compósitos não-carregados (UNCs) foram imersos em 30 mL de PBS (pH 7,0) e mantidos à 37 °C, com agitação horizontal (100 rpm). Após intervalos de tempo pré determinados (2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 h), uma alíquota (2 mL) foi removida e imediatamente repostada por PBS fresco (2 mL) para manter as condições iniciais. As alíquotas recolhidas foram analisadas por UV-VIS para estimar a degradação dos

materiais e para determinar o conteúdo de fenólicos totais. O conteúdo de fenólicos totais foi expresso em porcentagem da massa total acumulada no meio de liberação em cada um dos tempos em  $\mu\text{g}$  de equivalentes de ácido gálico (EAG) por mL. As alíquotas foram também analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinar a liberação dos compostos fenólicos majoritários do extrato de macela, i.e., 3-O-metilquercetina (3-O-MQ) e achyrobichalcona (ACB), expressa em porcentagem da massa total acumulada no meio de liberação em cada um dos tempos em  $\mu\text{g}$  de equivalentes de quercetina (EQ) por mL. Os ensaios foram realizados em quadruplicata. As alíquotas foram analisadas em triplicata. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  SD.

### **Análises em UV-VIS**

A varredura UV-VIS das alíquotas foi realizada com o objetivo de estimar a liberação dos ativos através do entumescimento e da degradação dos NCs. As amostras coletadas foram analisadas nas faixas de comprimento de onda entre 200 a 800 nm. As comparações foram realizadas no comprimento máximo de absorção encontrado, i.e., 300 nm. O PBS foi usado como branco.

### **Fenólicos Totais**

O conteúdo de fenólicos totais das amostras coletadas foi determinado com base no método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton e Rossi, 1965), utilizando uma curva padrão de ácido gálico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 10–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $y = 0,004x$ ;  $R^2 = 0,984$ ).

### **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

As amostras foram analisadas em um CLAE Thermo Scientific UltiMate 3000 RS Dual System (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) usando uma coluna de fase reversa C18 (4,6 x 150 mm; 5  $\mu\text{m}$ ; 120Å; Acclaim<sup>TM</sup>120, Thermo Scientific ©) em 25 °C, operando a 240, 270, 320 e 375 nm. A fase móvel consistiu em água Milli-Q® acidificada a pH 2,3 (A) e metanol (B) eluído a 1,0 mL de fluxo  $\text{min}^{-1}$  usando o seguinte programa de gradiente: 0-5 min, 90% A; 5-25 min, 30% A; 25-37 min, 90% A. A identificação da 3-O metilquercetina (3-O-MQ) foi realizada por comparação com os

tempos de retenção dos padrões comerciais (Sigma-Aldrich). A identificação da achyrobichalcona (ACB) foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (UFRGS) conforme metodologia descrita por Bianchi et al. (2019) e Carini et al. (2013). A quantificação foi baseada na integração das áreas de pico através da curva de calibração da quercetina (Sigma-Aldrich; Q4951) (faixa de concentração de 0,97 –1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $r^2 > 0.999$ ,  $y = 0.168x$ ). A metodologia foi padronizada em estudo prévio deste grupo de pesquisa (Pinheiro Machado et al., 2020a). O limite de detecção (DL) foi de 0,19  $\mu\text{g mL}^{-1}$  enquanto o limite de quantificação (QL) foi de 0,63  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Para o desvio padrão da resposta ( $\sigma$ ) foram considerados os eixos y obtidos nas três curvas de calibração e para a inclinação da curva de calibração média *S*.

### **Atividade Antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana dos NCs foi avaliada pela curva de crescimento de bactérias e pelo método de microdiluição em caldo descritos abaixo.

#### ***Inibição da curva de crescimento bacteriano***

Uma curva de crescimento foi preparada para a cepa bacteriana ATCC 33592 (cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Resumidamente, 75 mL de caldo TSA foram inoculados com 0,75 mL de cultura líquida do microrganismo ( $1,5 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) e incubados a 37°C com agitação de 100 rpm em sistema Dubinhoff. Simultaneamente, para a inibição da curva de crescimento bacteriano, os NCs carregados com extrato de macela em nanoemulsão, ou seja, 1,25 mg/g de gel foram colocados em contato com a curva de crescimento bacteriano. Alíquotas (3 mL) foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (1, 2, 3, 4, 5 e 6h) e a densidade óptica foi medida a 620 nm, usando caldo TSA como amostra de referência (branco). Para comparação, controles negativos, isto é, inóculo + caldo, NCs + caldo e UNCs + caldo foram incluídos. O estudo foi realizado em triplicata e seguiu a metodologia proposta por de Lima et al. (2016).

#### ***Microdiluição em Caldo***

Os NCs foram testados contra *S. aureus* ATCC 33592 e quatro isolados de *S. aureus* resistentes à meticilina (SARM) de leite mastítico disponíveis na Bacterioteca do

LABINAT (UFSC), usando o método de microdiluição em caldo (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003). Anteriormente, os NCs foram diluídos em PBS estéril por 24 h a 20°C sem agitação. Após o período de incubação, o sobrenadante foi utilizado para a realização do teste de microdiluição. Uma alíquota desse sobrenadante (100 µL) foi adicionada a 100 µL de caldo Muller Hinton (MH). As concentrações testadas foram correspondentes a concentração de extrato de macela nos NCS (1250-10 µg/ml). A densidade populacional inicial do inóculo foi padronizada por meio do controle de turbidez equivalente a uma solução padrão 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^7$  a  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>). Após a diluição, 10 µL do inóculo bacteriano padronizado correspondente a  $1,5 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> foram adicionados aos poços da microplaca e incubados a 35°C por 20 h. Para comparação, o sobrenadante dos UNCs foi testado nas mesmas concentrações. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como aquelas concentrações que não apresentaram crescimento visível, o que foi confirmado pela adição de 50 µL de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido) (100 µg mL<sup>-1</sup>). Nesse caso, as células metabolicamente ativas são capazes de reduzir a resazurina corada com azul para resorufina corada com rosa (Sarker et al., 2007). A porcentagem de inibição do crescimento bacteriano foi determinada pela leitura da absorbância a 625 nm usando um leitor de microplaca (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, EUA) e a seguinte fórmula:  $BI (\%) = [1 - (AT / AI) \times 100]$ , onde BI é a inibição do crescimento bacteriano, AT é a absorbância média das concentrações de NCs testadas com o inóculo subtraído do valor de absorbância das mesmas concentrações de NCs sem a adição de inóculo, e AI é a absorbância média do controle crescimento microbiano.

### **Citotoxicidade dos compósitos não carregados (UNCs) em células MAC-T**

Células epiteliais mamárias bovinas (linhagem MAC-T) do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) foram mantidas em cultura. Resumidamente, as células MAC-T foram cultivadas em meio de DMEM modificado e suplementado com 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 20% (v/v) soro fetal bovino inativado (FBS, Gibco, CA, EUA), L-glutamina 4 mM (Synth), glicose 4,5 g/L (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), piruvato de sódio 1 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), bicarbonato de sódio 1,5 g/L (Vetec™ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), insulina 5 µg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e hidrocortisona 1 µg/mL (Sigma –

Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e mantidas a 37°C com 5% de CO<sup>2</sup> em estufa umidificada. O meio foi trocado a cada 48 h. Quando as células atingiram 70% de confluência, foram tratadas com tripsina 0,25% e EDTA 1 mM para preparar a suspensão celular (10<sup>5</sup> células / mL). A suspensão foi transferida para uma microplaca de 96 poços (100 µL/poço), seguida de incubação por 24 h para aderência. Simultaneamente, os UNC's foram colocados em meio DMEM (meio de extração) e mantidos por 24 h nas mesmas condições de cultivo celular. Após 24 h (período de adesão celular), o meio de cultura nas placas foi substituído pelo meio de extração e as células foram cultivadas por mais 24 h. A citotoxicidade foi determinada com base no método do MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio; 0,5 mg / mL). Neste ensaio, quantifica-se quanto do MTT presente no meio foi reduzido pela atividade metabólica celular ligada a NADH e NADHP, formando cristais de formazan de cor azul (Mosmann, 1983). O formazan formado foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e a absorção medida a 540 nm. A intensidade da coloração obtida foi considerada diretamente proporcional ao número de células viáveis, indicando a viabilidade celular. Células não tratadas cultivadas em DMEM foram consideradas 100% viáveis. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### **Análises Estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, utilizando o software Graph-Pad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Valores de P <0,05 foram considerados significativos. Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão (DP). Os espectros obtidos por FTIR dos nanocompósitos NC-5:5, NC-7:3 e NC-8:2 carregados com a nanoemulsão-macela e dos UNC's (compósitos não carregados com a nanoemulsão-macela; UNC-5:5, UNC-7:3 e UNC-8:2), foram submetidos à análise não-supervisionada de componentes principais (APC) e análises de agrupamentos a partir de matrizes de correlação, utilizando a linguagem R© (RDCT, 2010). Os scripts foram escritos em linguagem R (v. 3.3.1) e disponíveis no pacote *specmine* (Costa et al., 2015).

### **Resultados e Discussão**

No presente trabalho, pretendeu-se associar a nanoemulsão de macela, com reconhecida atividade antimicrobiana (Pinheiro Machado et al., 2020a), com veículos de origem

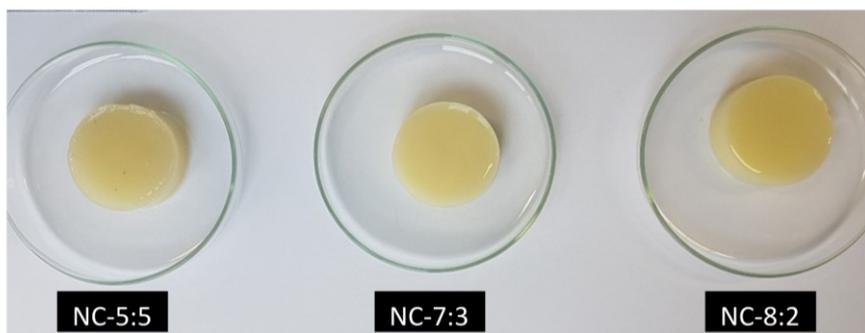
natural, ou seja, k-carragenana e mucilagem de linhaça, para o desenvolvimento de nanocompósitos sustentáveis inovadores. Para cada NC desenvolvido um estudo sistemático de composição, em relação às proporções de nanoemulsão de macela, k-carragenana e mucilagem de linhaça foi realizado com o objetivo de otimizar as propriedades físico-químicas e encontrar as condições mais estáveis e a viscosidade adequada ao melhor desempenho da liberação gradual dos ativos antimicrobianos da macela, visando seu uso na terapêutica da mastite bovina. Os compósitos de mucilagem de linhaça e carragenana têm apresentado grande potencial de gelificação e menor sinérese (Chen et al., 2006), sustentando a escolha destes materiais como veículos para a liberação da nanoemulsão de macela. Assim, através desta proposta inovadora buscou-se desenvolver e otimizar os parâmetros dos NCs visando a sua aplicação intramamária como agente antimicrobiano contra patógenos causadores de mastite bovina. Destaca-se ainda que estes NCs podem atender às demandas dos diferentes sistemas de produção leiteira em termos de substituição de antimicrobianos convencionais e com possibilidade de uso em sistemas orgânicos e agroecológicos.

### **Desenvolvimento dos hidrogéis a base de mucilagem de linhaça e k-carragenana carregado com nanoemulsão-macela (nanocompósitos- NCs)**

Inicialmente, sete compósitos a base de k-carragenana e mucilagem de linhaça desenvolvidos apresentaram características termorreversíveis, i.e., líquidos quando aquecidos em temperaturas entre 40 e 60°C e em condição de gel entre 30 e 25 °C. Dentre esses, foram selecionados os compósitos 5:5, 7:3 e 8:2 (m/m) de k-carragenana e mucilagem de linhaça, respectivamente, para desenvolvimento de nanocompósitos (NCs) antimicrobianos pela adição da nanoemulsão de macela (Tabela 1). A seleção desses compósitos levou em consideração o aspecto visual em condição de gel e a capacidade de se incorporar o teor desejado de extrato de macela via nanoemulsão, i.e., 1,25 mg/g de gel.

A adição da nanoemulsão de macela aos compósitos não resultou em modificação macroscópica evidente, exceto pela coloração amarelada característica da nanoemulsão (Figura 1). Para os NC-7:3 e NC-8:2 foi observado um aspecto físico mais enrijecido em temperatura ambiente (25°C) devido possivelmente a menor concentração de

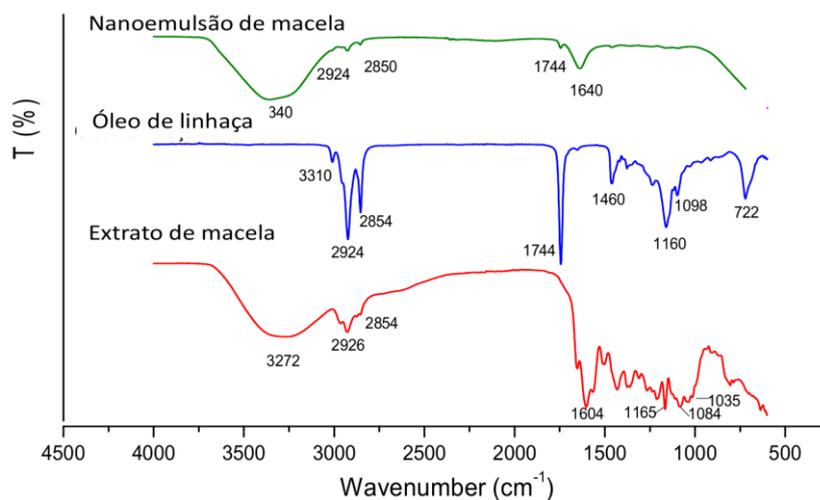
mucilagem de linhaça (Tabela 1). O aspecto visual dos três materiais selecionados está apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Imagem macroscópica dos nanocompósitos (NCs) desenvolvidos nas proporções de k-carragenana/mucilagem de linhaça NC-5:5, NC-7:3 e NC-8:2 (m/m) carregados com 1,25 mg de extrato de macela na nanoemulsão por g de gel.

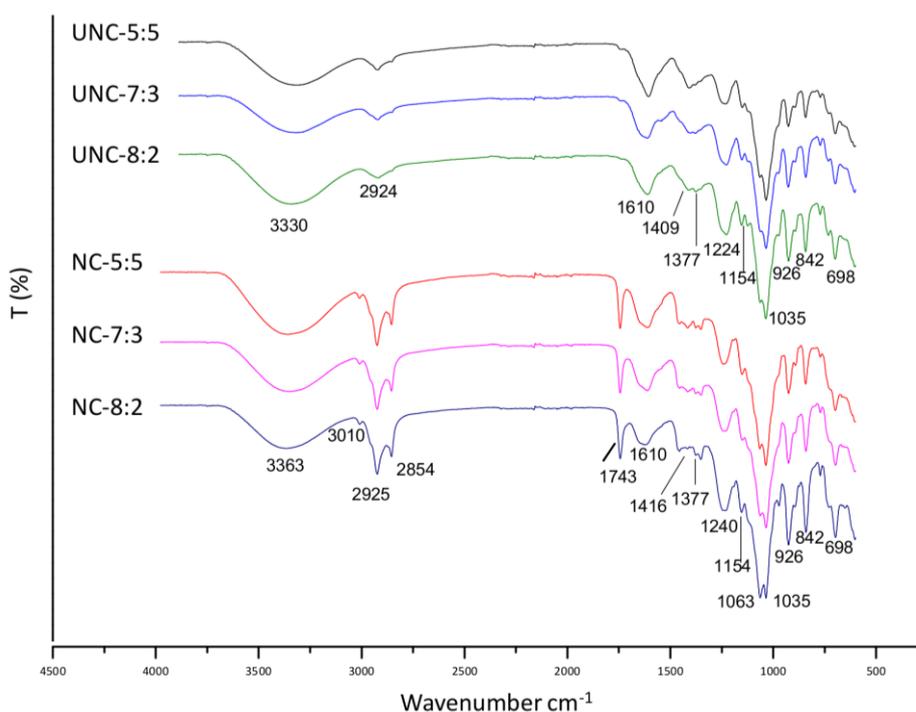
### **Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

Com o objetivo de investigar o estabelecimento de ligações químicas entre os componentes da nanoemulsão e os polímeros empregou-se a análise via FTIR dos materiais desenvolvidos. A figura 2 mostra os perfis espectrais da nanoemulsão de macela e de seus componentes, i.e., óleo de linhaça e extrato de macela.



**Figura 2.** Espectros obtidos por FTIR da nanoemulsão de macela, do extrato de macela liofilizado e do óleo de linhaça, constituintes da nanoemulsão presente nos NCs desenvolvidos.

Sabendo que os compostos fenólicos são majoritários no extrato de macela (Pinheiro Machado et al., 2020a, Retta et al., 2012) foi possível identificar no espectro correspondente (Figura 2), bandas características desses compostos, como em  $\sim 3272\text{ cm}^{-1}$ , (O-H fenol),  $2926\text{-}2854\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H) e  $1604\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$  (C=C aromáticos). No óleo de linhaça, foram encontradas as bandas características de ácidos graxos insaturados tais como  $3010\text{-}2854\text{ cm}^{-1}$  (C-H compostos insaturados e alifáticos, respectivamente),  $\sim 1744\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=C) e  $\sim 722\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  de bandas de cadeia longa) (Figura 2). No espectro correspondente à nanoemulsão de macela, além das duas bandas que podem estar sendo influenciadas devido a presença de água ( $\sim 3340\text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ ), também aparecem discretamente as bandas  $\sim 2924\text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 1744\text{ cm}^{-1}$ , as quais podem ser atribuídas ao óleo de linhaça e ao extrato de macela, pois são coincidentes com algumas bandas presentes na análise dos mesmos (Figura 2). A figura 3 mostra os espectros FTIR representativos dos NC-5:5, NC-7:3 e NC-8:2 e dos UNC's (compósitos não carregados; UNC-5:5 UNC-7:3 e UNC-8:2), todos liofilizados.



**Figura 3.** Espectros FTIR dos NC-5:5, NC-7:3 e NC-8:2 carregados com a nanoemulsão de macela e dos UNC's (compósitos não carregados com a nanoemulsão de macela; UN-5:5, UN-7:3 e UN-8:2).

Ao comparar os espectros dos UNC's nota-se que não há diferenças visíveis entre os materiais. Da mesma forma, não há diferenças significativas ao comparar entre si os espectros dos NC's, mostrando aparentemente que as diferentes concentrações de k-carragenana e mucilagem de linhaça não interferiram nos espectros de FTIR. As principais bandas nos espectros de FTIR da k-carragenana, da mucilagem de linhaça e dos polissacarídeos da linhaça foram encontradas na literatura (Tabela 2).

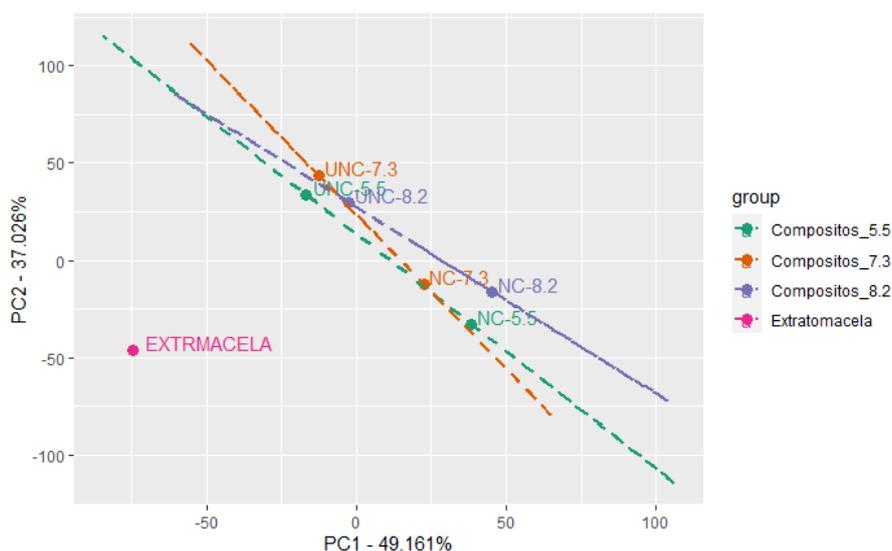
**Tabela 2.** Relação das bandas características por FTIR encontradas na literatura e comparação com as bandas obtidas nesse estudo.

<b>Bandas</b> <b>(cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Vibração dos grupos</b>	<b>UNCs</b> <b>(cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>NCs</b> <b>(cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referência</b>
3340	O-H, (glicerol ligado e integrado à carragenana na formação do hidrogel)	3330	3363	Vanegas et al., 2019
3294	O-H de polissacarídeos			Mujtaba et al., 2019
3450	O-H			Haseeb et al., 2019
			3010	
2924	estiramento C-H de polissacarídeos	2924	(C-H) 2925	Mujtaba et al., 2019
2900	C-H		2854 e 1743 (C=C)	Haseeb et al., 2019
1640 e 1420	grupos carboxílicos desprotonados COO <sup>-</sup>	1610	1610	Haseeb et al., 2019
1643	estiramento de C=O da proteína			Mujtaba et al., 2019
1417	vibrações no plano dos grupos C-H	1409	1416	Mujtaba et al., 2019
1422 e 1226	estiramento das ligações éster-sulfato	1377	1377	Vanegas et al., 2019
1226	éster sulfato	1224	1240	Vanegas et al., 2019
1200 a 1000	ligação glicosídica C-O-C e			Haseeb et al., 2019
1158	vibrações de estiramento C-O-H de grupos laterais do polissacarídeo C-O do anel 3,6-anidro-l-galactopiranosose (deslocadas de 1034 cm <sup>-1</sup> )	1154	1154	Vanegas et al., 2019
1033	ligação glicosídica dos polissacarídeos hemicelulósicos	1035	1063	Mujtaba et al., 2019
			1035	
912	C-O de κ-carragenana a, indicando grupo 3,6-anidro-d-galactose	926	926	Vanegas et al., 2019
844	C-O-SO <sub>4</sub> no carbono C4 do d-galactose-4-sulfato	842	842	Vanegas et al., 2019
697	flexão do anel da galactose	698	698	

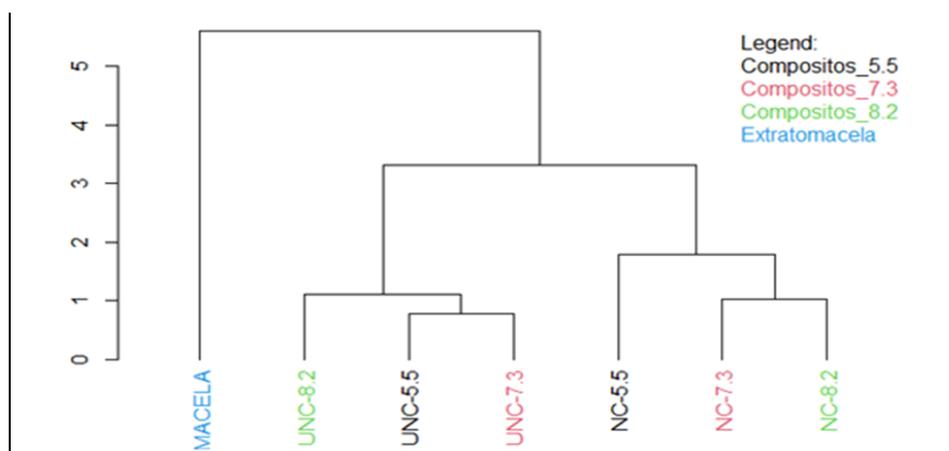
Na análise dos espectros dos UNC's e dos NC's é possível identificar a presença de diversas bandas já relatadas na literatura para a k-carragenana e os polissacarídeos da linhaça conforme mostrado na tabela 2. Comparando os espectros dos UNC's e NC's foram encontradas algumas bandas apenas nos materiais contendo a nanoemulsão de macela. Nos espectros dos NC's houve o surgimento de bandas em  $\sim 3010\text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 2925\text{ cm}^{-1}$  (intensificada),  $\sim 2854\text{ cm}^{-1}$  e  $\sim 1744\text{ cm}^{-1}$ , podendo ser estas atribuídas à presença do óleo de linhaça, principalmente a primeira e a última, e as demais ao extrato de macela. A existência de tais bandas foi discutida na análise dos seus espectros isolados (Figura 2), o que confirma a incorporação da nanoemulsão nos NC's pelo FTIR. Além dessas bandas nestes materiais houve um leve deslocamento da banda de OH, de  $\sim 3330$  para  $3363\text{ cm}^{-1}$  e a redução da banda em  $1610\text{ cm}^{-1}$  (C=O), o que possivelmente ocorreu devido à presença das ligações de hidrogênio com a adição da nanoemulsão (Muhammad et al., 2019). Cabe destacar ainda que através da análise visual dos espectros a interação química entre os componentes da nanoemulsão com os polímeros utilizados não foi evidenciada, uma vez que não houve o surgimento de novas bandas nos espectros dos materiais contendo a nanoemulsão. Desse modo, pode-se sugerir que houve apenas interação física entre eles.

Como a análise dos perfis espectrais de FTIR dos materiais desenvolvidos não revelou clara diferença entre eles, exceto pela incorporação da nanoemulsão de macela (Tabela 2), a análise multivariada foi empregada com o objetivo de realizar uma análise exploratória e discriminatória dos NC's e dos UNC's visando a detecção de possíveis diferenças não perceptíveis a olho nú. Através das ferramentas da análise multivariada tem sido possível detectar tais diferenças de diferentes matrizes (Kuhnen et al., 2010a; Maraschin et al., 2016). A aplicação de métodos estatísticos dessa natureza em associação com técnicas de detecção de compostos, como por exemplo, a espectrometria (FTIR, UV-vis, NIR, RMN) são ferramentas úteis para auxiliar na caracterização e discriminação de diferentes materiais (Casale et al., 2015; Maraschin et al., 2016), principalmente de matrizes complexas (Kuhnen et al., 2010a; Kuhnen et al., 2010b; Maraschin et al., 2015). Similarmente tem sido relatada a utilização da análise multivariada para discriminar hidrogeis, principalmente para determinar sistematicamente a influência e a significância da composição do hidrogel, demais características físico-químicas e propriedades das misturas desenvolvidas (Edlund & Albertsson, 2008; Patel et al., 2014).

No presente estudo, ao aplicar a análise de componentes principais (ACP) aos espectros dos NCs e dos UNCs, os eixos PC1 e PC2 explicaram cerca de 49% e 37% da variabilidade dos dados, respectivamente (Figura 4). Observa-se, juntamente com a análise de agrupamento hierárquico (Figura 5), a formação de três grupos em relação aos materiais e o extrato de macela (Figuras 4 e 5). Um dos grupos foi formado pelos NCs 5:5, 7:3 e 8:2, separando-se dos UNCs 5:5, 7:3 e 8:2, os quais formaram um outro agrupamento (Figuras 4 e 5). O terceiro grupo foi formado pelo espectro do extrato de macela, tendo sido o que mais diferiu quimicamente dos outros dois (Figuras 4 e 5). Os números de onda que mais contribuíram para a separação observada situaram-se na faixa entre 1500 e 1750  $\text{cm}^{-1}$ . Destaca-se que nessa região estão os comprimentos de onda fortemente relacionados com as bandas dos componentes da nanoemulsão, i.e., extrato de macela e óleo de linhaça (Figura 2). Na análise realizada, a sobreposição dos materiais desenvolvidos (NCs x UNCs) (Figura 4) e a menor distância euclidiana encontrada entre eles (Figura 5) sugere a similaridade entre eles, não tendo possivelmente aparecido novas bandas pela incorporação da nanoemulsão de macela nos NCs. Este fato reforça a hipótese de que entre a nanoemulsão e os polímeros, i.e., k-carragenana e mucilagem de linhaça houve apenas interação física.



**Figura 4.** Distribuição fatorial dos componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2) dos espectros de reflectância na região do infravermelho com transformada de Fourier (500 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ) dos NCs 5:5, 7:3 e 8:2 carregados com a nanoemulsão-macela e dos UNCs 5:5, 7:3 e 8:2 (compósitos não carregados com a nanoemulsão-macela).



**Figura 5.** Dendogramas de espectros obtidos pela análise de agrupamento hierárquico utilizando distância euclidiana, em relação ao extrato de macela, NCs 5:5, 7:3 e 8:2 carregados com a nanoemulsão-macela e dos UNCs 5:5, 7:3 e 8:2 (compósitos não carregados com a nanoemulsão-macela na região entre 500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ).

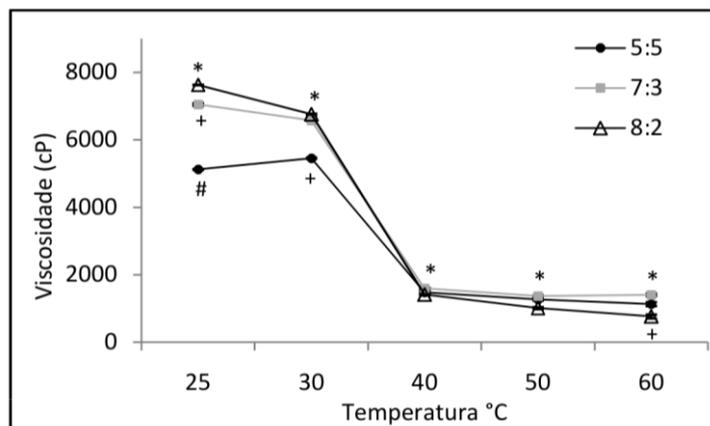
O emprego da análise por espectroscopia de FTIR combinada à análise multivariada já foi realizado com o objetivo de investigar os mecanismos de ligação de nanopartículas de Ag e  $\text{TiO}_2$  as resinas Chelex®-100 and Metsorb™ (Pouran et al., 2020). No estudo, os autores identificaram a formação de ligações químicas entre os materiais após incorporação das nanopartículas (Pouran et al., 2020). Similarmente, Faria et al. (2019) utilizaram a análise multivariada para discriminar três materiais nanocompósitos com base em características estruturais, morfológicas e de superfície.

No presente estudo, a aplicação das ferramentas de estatística multivariada (análise de agrupamento hierárquico e a análise dos componentes principais ACP) aos espectros de infravermelho permitiram uma melhor identificação das diferenças/semelhanças espectrais entre os materiais desenvolvidos. Os resultados dessas análises reforçaram a hipótese de haver apenas interação física entre a nanoemulsão e os polímeros, i.e., k-carragenana e mucilagem de linhaça, componentes dos nanocompósitos desenvolvidos.

### **Comportamento Viscosimétrico dos nanocompósitos (NCs)**

Esta análise teve como objetivo verificar o comportamento viscosimétrico dos materiais desenvolvidos em uma faixa de temperatura que abrangesse as temperaturas de preparo, a retal animal e a ambiente, a fim de relacionar este parâmetro com o perfil de liberação

dos ativos antimicrobianos da nanoemulsão de macela visando à futura aplicação intramamária destes materiais. A análise da viscosidade dos NCs em estudo mostrou sofrer influência da temperatura, diminuindo os valores deste parâmetro com o aumento da temperatura (Figura 6).



**Figura 6.** Viscosidade em reômetro Brookfield DV-II+Pro utilizando o spindle LV4 dos nanocompósitos carregados com a nanoemulsão de macela contendo as proporções de k-carragenana e mucilagem de linhaça NC-5:5, NC-7:3 e NC-8:2 (m/m), respectivamente, em função da temperatura, 60 rpm. Foram realizadas cinco medições de viscosidade, com intervalo de 10 s entre cada medida. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  SD para cada temperatura avaliada. Símbolos diferentes indicam diferença estatística entre os nanocompósitos na mesma temperatura.

De maneira geral, as maiores alterações nos valores de viscosidade foram observadas entre 30 e 40°C (Figura 6). Na temperatura de 40 °C todos os três materiais mostraram um estado intermediário de viscosidade de 1500 cP (Figura 6). Considerando que os valores normais de temperatura retal para vacas leiteiras estão entre 38 e 39,5° C (Cunningham e Klein, 2008), pode-se sugerir que a condição de gel dos NCs nessa faixa de temperatura poderia também facilitar a liberação inicial dos ativos antimicrobianos presentes na nanoemulsão de macela incorporada (Puttipipatkachorn et al., 2001), bem como poderia possibilitar um maior alcance no interior da glândula mamária, passando pelas cisternas, atingindo os ductos e os alvéolos mamários. É importante destacar que para que um fármaco seja eficaz, é necessário atingir concentrações terapêuticas no local da infecção (biofase), levando em consideração que os patógenos podem estar

livres, ligados à superfície das membranas ou até viver no compartimento intracelular como é o caso de *S. aureus* (Erskine et al., 2003; Gruet et al., 2001; Sandasi et al., 2010).

Na temperatura de 25°C, o NC-5:5 destacou-se dos demais por apresentar menor viscosidade, podendo ser considerada uma vantagem em termos de aplicação intramamária *in vivo* (Figura 6). A maior viscosidade encontrada para os NC-7:3 e NC-8:2 entre as temperaturas de 25 e 30°C pode ser devido às menores concentrações de mucilagem de linhaça e maiores concentrações de k-carragenana utilizadas na composição desses materiais. É importante destacar que a maior viscosidade encontrada para os três NCs em temperaturas próximas à condição ambiental (25°C) pode sugerir a manutenção das características físicas nessa temperatura devido à constituição dos sistemas. Nessas condições, os materiais podem permitir maior retenção da nanoemulsão de macela, contribuindo para o seu armazenamento em condições próximas à temperatura ambiente. Estudos anteriores mostraram que o aumento da viscosidade de materiais desenvolvidos a base de carragenana e mucilagem de linhaça pôde permitir maior capacidade de retenção de água ou similares e também pôde contribuir com a redução da sinérese deste compósito, uma importante característica para a conservação e armazenagem (Chen et al., 2006). Neste mesmo estudo, a adição da mucilagem de linhaça à carragenana (1% m/m) aumentou a viscosidade do compósito, o qual apresentou temperatura de gelificação em torno de 45 °C, valor um pouco superior ao encontrado no presente estudo (Chen et al., 2006). As diferenças encontradas entre o estudo anterior e o presente estudo podem ser justificadas pelas distintas concentrações dos polímeros utilizadas.

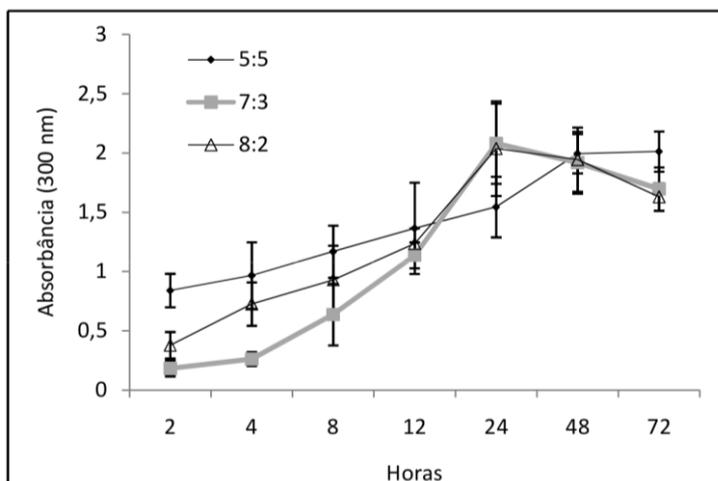
O uso de polissacarídeos para aumentar a viscosidade de formulações mostrou que a alta viscosidade em solução aquosa apresentada por esses materiais permite a obtenção de um produto de elevado valor tecnológico à indústria farmacêutica (Chen et al., 2006; Makino et al., 2001). Estudos sobre a viscosidade de formulações farmacêuticas têm se tornado cada vez mais frequentes por ter relação com a conservação, estabilidade, liberação dos ativos e eficácia das mesmas (Puttipatkhachorn et al., 2001). Destaca-se que até o presente momento, a mistura de k-carragenana, mucilagem de linhaça e nanoemulsão de macela não havia sido descrita na literatura. O desenvolvimento inovador destes NCs através da mistura de três

materiais de origem natural pode representar sistemas farmacêuticos sustentáveis com potencial de uso na liberação gradativa de princípios ativos antimicrobianos, com aplicação na mastite bovina e em outros sistemas de controle microbiano.

### **Estudo de liberação do hidrogel a base de mucilagem de linhaça e k-carragenana carregado com nanoemulsão-macela (Nanocompósitos- NCs)**

#### ***Análises em UV-VIS***

As alíquotas dos NCs e os UNCs foram inicialmente analisadas por UV-Vis, em uma janela espectral de 200 a 800 nm (dados não mostrados), com o objetivo de estimar a liberação dos ativos encapsulados e livres da nanoemulsão através do seu entumescimento e da sua degradação. A análise das varreduras mostrou que o comprimento de onda com absorção máxima dos NCs foi 300 nm (Figura 7). Este comprimento de onda coincide com o espectro de absorção dos compostos fenólicos (Mabry et al., 1970), os quais são os compostos majoritários do extrato de macela (Retta et al., 2012). Para os UNCs não foi observada absorção em 300 nm (dados não mostrados).



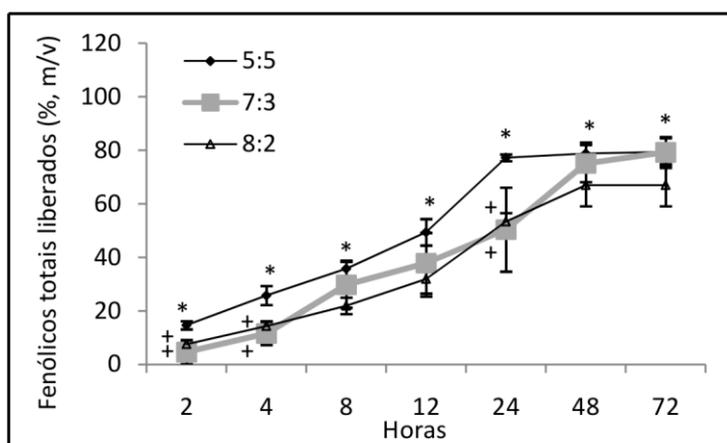
**Figura 7.** Perfil de turbidez determinado via UV-VIS (300 nm) como estimativa da liberação dos nanocompósitos carregados com a nanoemulsão de macela (NCs) contendo as proporções de k-carragenana e mucilagem de linhaça 8:2, 7:3 e 5:5 (m/m), respectivamente ao longo de 72 h. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP.

Considerando que o aumento dos valores de absorbância a 300 nm foi encontrado

apenas entre os NCs carregados, podemos sugerir que a turbidez do meio de liberação deveu-se a liberação dos ativos da nanoemulsão de macela incorporada nos materiais. De maneira geral, os três NCs mostraram aumento da turbidez ao longo do tempo, sugerindo a possível liberação sustentada dos ativos da nanoemulsão de macela por até 72 h (Figura 7). As diferenças entre os três materiais foram encontradas apenas nos tempos iniciais de 2 e 4 h, nos quais os NC-7:3 e NC-8:2 mostraram menor turbidez, sugerindo uma desintegração mais lenta (Figura 7). As diferenças encontradas provavelmente têm relação com a estrutura destes NCs devido à forte ligação física entre os polímeros pela maior proporção de k-carragenana em suas composições (Tabela 1). Estudo anterior relacionou a alta capacidade de retenção de água da carragenana com o mecanismo de liberação de ativos por desintegração/degradação, em vez do inchaço da matriz (Tapia et al., 2004). Nesse contexto, a maior turbidez inicial e sustentada ao longo do tempo apresentada pelo NC-5:5 pode ser mais interessante para o controle microbiano no contexto da terapêutica da mastite bovina no período seco, pois a fase inicial deste período tem sido considerada a mais crítica para infecções microbianas (Sordillo, 2016).

### ***Fenólicos Totais***

Maior porcentagem de liberação de compostos fenólicos nas primeiras 4 h foi observada para o NC-5:5. Em contrapartida, para os NCs 7:3 e 8:2 houve menor liberação, corroborando com os resultados da análise do meio de liberação por UV-Vis a 300 nm (Figura 7) que sugeriu a desintegração inicial mais lenta destes dois materiais (Figura 8;  $P < 0,05$ ).



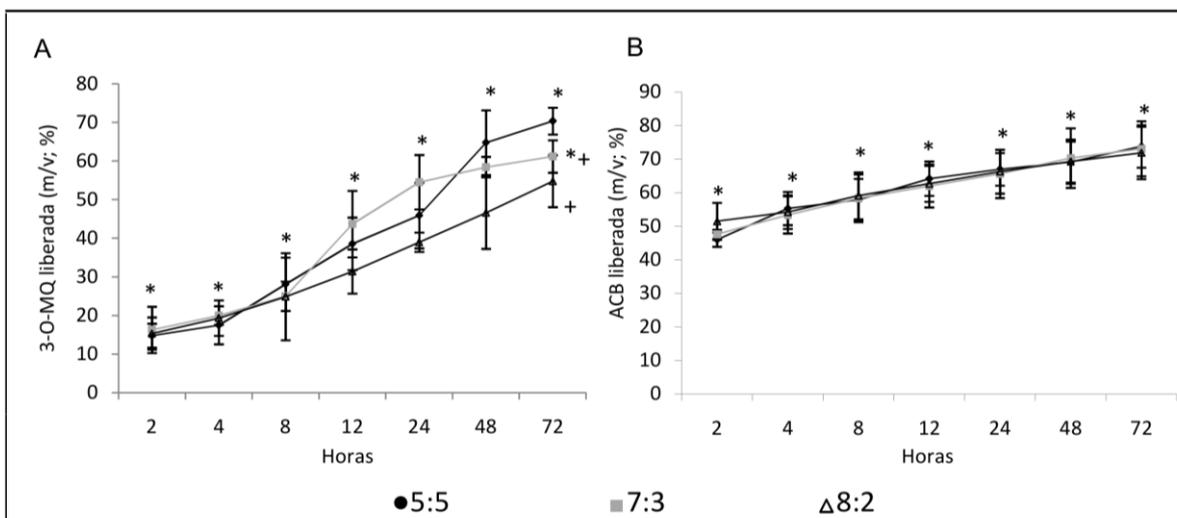
**Figura 8.** Porcentagem da massa de fenólicos total acumulada e liberada da nanoemulsão de macela dos nanocompósitos (NCs) contendo as proporções de k-carragenana e mucilagem de linhaça 8:2, 7:3 e 5:5 (m/m), respectivamente, ao longo de 72 h. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP ( $P < 0,05$ ). Símbolos diferentes indicam diferença estatística entre os NCs no mesmo tempo de coleta.

Diferentes picos de liberação de fenólicos também foram observados entre os nanocompósitos. O NC-5:5 mostrou um pico máximo de liberação com 24 h, enquanto para o NC-7:3 e o NC-8:2 este pico ocorreu apenas com 48 h (Figura 8). A influência das diferentes composições dos materiais em termos de proporção de k-carragenana e mucilagem de linhaça deve explicar as diferenças observadas. Ao relacionar os resultados de viscosidade encontrados para os NCs com os resultados do ensaio de liberação cinética, esperava-se encontrar entre eles um comportamento de liberação dos compostos ativos similar, pois a 37°C o comportamento viscosimétrico dos mesmos foi também semelhante (Figura 2).

Os três NCs apresentaram perfil de liberação gradual dos ativos fenólicos da nanoemulsão de macela atingindo aproximadamente 80% (m/v) em 72 h. O perfil gradual de liberação de fenólicos evidenciado deveu-se principalmente às interações ativos-polímeros. Resultados similares da avaliação da liberação de compostos bioativos retidos em hidrogel de carragenana sustentaram o seu uso na liberação gradativa de ativos, com perfil crescente até 48 h, seguido de um declínio nos valores de absorvância com 72 h (Makino et al., 2001). Visando a aplicação intramamária dos NCs durante o período seco, as evidências de que as glândulas mamárias bovinas são altamente suscetíveis a novas infecções intramamárias durante a transição fisiológica da lactação para o período seco e do período seco para o início da lactação (Sordillo, 2016), pode conferir uma vantagem ao NC 5:5 que mostrou maior liberação inicial dos ativos fenólicos antimicrobianos.

### **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Os compostos fenólicos livres e encapsulados liberados da nanoemulsão de macela dos NCs para o meio, no ensaio de liberação cinética, detectados via CLAE foram 3-O-metilquercetina (3-O-MQ) e achyrobichalcona (ACB; Figura 9).



**Figura 9.** Porcentagem acumulada de 3-O-MQ (A) e ACB (B) da nanoemulsão liberados dos nanocompósitos (NCs) contendo as proporções de k-carragenana e mucilagem de linhaça 8:2, 7:3 e 5:5 (m/m), respectivamente ao longo de 72 h. Os resultados são expressos como média ± DP (P<0,05). Símbolos diferentes indicam diferença estatística entre os NCs no mesmo tempo de coleta.

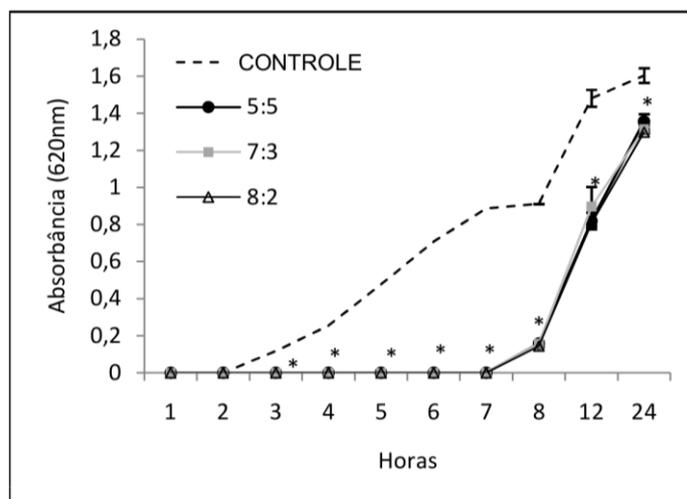
Os NCs 5:5, 7:3 e 8:2 mostraram pico de liberação da 3-O-MQ e da ACB em 72 h (Figura 7). O padrão de liberação da 3-O-MQ ao longo de 72 h mostrou-se mais lento e gradual em comparação à ACB. A ACB foi liberada rapidamente dos três NCs, atingindo valores próximos de 50% (m/v) de liberação já nas primeiras horas. Para o NC-5:5, por exemplo, cerca de 50% (m/v) da ACB foi liberada nas primeiras 2 h, atingindo aproximadamente 65% (m/v) de liberação nas 72 h (Figura 9). Em contrapartida, a 3-O-MQ do NC-5:5 só atingiu 50% (m/v) de liberação próximo das 24 h. Destaca-se que ambos os compostos não atingiram 100% de liberação no período analisado, sustentando um perfil de liberação gradativo. O perfil de liberação mais rápido da ACB foi devido possivelmente a sua maior polaridade, permitindo maior liberação já nas primeiras horas ao meio aquoso. Destaca-se que a complexidade em termos fitoquímicos apresentada pela macela e a diferença de polaridade desses compostos pode representar uma vantagem na liberação controlada dos ativos para o controle microbiano. Dessa forma, seria possível ter diversos compostos sendo liberados em diferentes momentos, os quais poderiam realizar o controle microbiano ao longo do tempo.

A biodisponibilidade das substâncias ativas pode variar de acordo com a formulação base utilizada, uma vez que exerce influência na liberação e conseqüentemente na atividade biológica de interesse (Knorst et al., 1991). A incorporação de formulações farmacêuticas em veículos compósitos hidrogéis tem permitido a ocorrência de um perfil de liberação gradativo, combinado com a manutenção da eficácia terapêutica. Em estudo prévio, hidrogéis desenvolvidos a base de carbapol como veículos de uma nanoemulsão de macela mostraram a influencia de uma barreira adicional à liberação dos ativos conferida pelo veículo que apresentou liberação mais lenta após a incorporação da formulação em sistemas semissólidos (Balestrin et al., 2016). A mucilagem de linhaça como veículo de liberação de ativos também mostrou que este material permitiu a liberação sustentada de fármacos por difusão apresentando resultados de liberação superiores aos de uma formulação comercial monitorado por 14 h à 37°C (Haseeb et al., 2016). No presente estudo, nota-se um tempo prolongado de persistência dos ativos da nanoemulsão de macela presente nos NCs, o qual tem relação com o aumento da viscosidade da nanoemulsão verificada no ensaio de viscosidade (Figura 2). Portanto, a condição de gel dos NCs desenvolvidos além de poder permitir maior capacidade de alcance aos ductos da glândula mamária, conferem difusão e liberação prolongada dos ativos da nanoemulsão de macela. Os resultados encontrados mostram que os NCs podem ser considerados veículos de liberação gradativa eficazes para a nanoemulsão.

## **Atividade Antimicrobiana**

### ***Inibição da curva de crescimento bacteriano***

Os NCs desenvolvidos controlaram o crescimento de *S. aureus* com OD<sub>620</sub> nm <0,2 até 8 horas de incubação (Figura 10). Não houve diferença nos valores de absorbância entre os UNCs e o controle com inóculo (caldo + inóculo).



**Figura 10.** Atividade antimicrobiana em caldo TSA dos nanocompósitos (NCs) carregados com a nanoemulsão de macela, contendo as proporções de k-carragenana e mucilagem de linhaça 5:5, 7:3 e 8:2 (m/m) respectivamente e controle (caldo + inóculo) nas curvas de crescimento de *S. aureus* ATCC 33592. As barras de erro representam as médias ( $\pm$  SD) de três experimentos independentes realizados em duplicata. Símbolos iguais indicam que não foi encontrada diferença estatística entre os nanocompósitos no mesmo tempo de coleta ( $P < 0,05$ ).

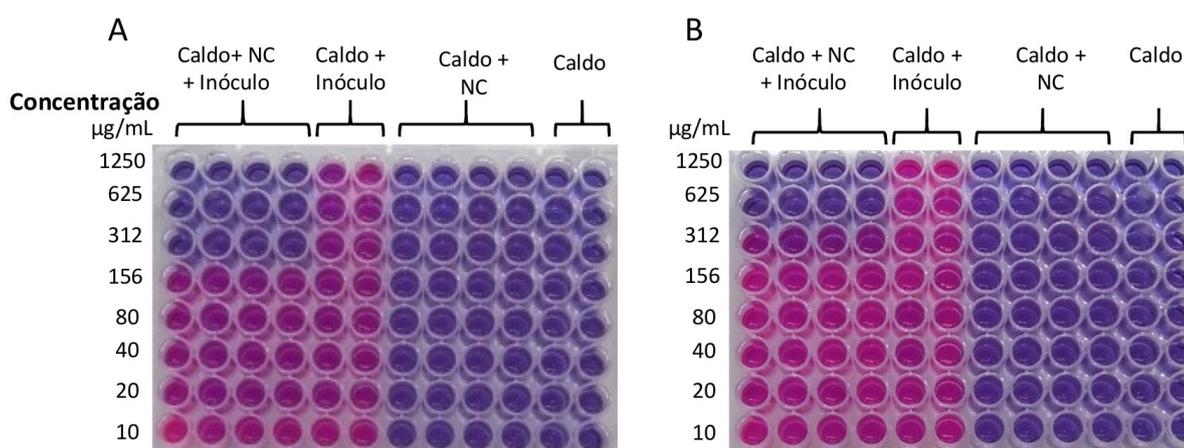
Este resultado está de acordo com os resultados das análises do perfil de liberação dos compostos fenólicos totais e dos compostos majoritários, i.e., 3-O-MQ e ACB dos NCs (Figuras 7, 8 e 9), os quais mostraram a ocorrência da liberação de ativos nas primeiras 8 h para os três materiais. Os fenólicos totais, por exemplo, foram liberados em concentrações próximas a 40  $\mu\text{g/mL}$  após 8 h, equivalente a 30% (m/v), sustentando o potencial antimicrobiano encontrado. Verificou-se também, por exemplo, que a liberação da 3-O-MQ e da ACB foi em torno de 30 e 60% (m/v), respectivamente, para os três NCs após 8 h de incubação (Figura 7;  $P < 0,05$ ). Os resultados encontrados são relevantes para a terapêutica da mastite bovina, pois *S. aureus* é uma bactéria frequentemente isolada em infecções de difícil tratamento (Erskine et al., 2003; Gruet et al., 2001; Hébert et al., 2000; Locatelli et al., 2017; Spohr et al., 2011). A aplicação intramamária de ativos antimicrobianos formulados em veículos de liberação gradativa e prolongada com maior tempo de persistência na glândula mamária tem sido relacionada ao sucesso dos tratamentos de infecções estafilocócicas (Cunningham e Klein, 2008; Fraser, 1996; Radostits et al., 2007;). Este sucesso depende do tempo de

liberação, do veículo de transporte utilizado, do tamanho das partículas dos ativos e da capacidade de difusão dos antimicrobianos (Radostits et al., 2007). Em contexto semelhante, hidrogéis a base de quitosana foram investigados para aplicação intramamária, sendo associados à capacidade de ativação da resposta imune, aceleração da involução da glândula e ao potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus* sp. (Lanctôt et al., 2017; Orellano et al., 2019).

No presente estudo, a liberação gradativa e a capacidade de controle do crescimento microbiano apresentadas pelos NCs desenvolvidos mostra o potencial de uso destes materiais na terapêutica intramamária da mastite bovina, principalmente em sistemas sustentáveis de produção leiteira, mas não se limitando a estes. Novas abordagens terapêuticas que substituam o uso de antimicrobianos comumente utilizados na produção leiteira convencional são igualmente necessárias.

### ***Microdiluição em caldo***

Neste ensaio, os três NCs reduziram o crescimento microbiano de todas as amostras de SARM (isoladas de leite mastítico e ATCC 33592) após 24 h de exposição. Entretanto, distintos valores de CIM foram encontrados entre os materiais desenvolvidos. Para o NC-5:5, a CIM foi 312  $\mu\text{g/mL}$  enquanto para os NCs 7:3 e NC-8:2 foram 625  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 11).



**Figura 11.** (A) Atividade bacteriana após exposição a diferentes concentrações do NC-5:5 (m/m) mostrando a CIM de 312  $\mu\text{g/mL}$  e (B) atividade bacteriana após exposição a diferentes concentrações dos NCs-7:3 e 8:2 (m/m) mostrando a CIM de 625  $\mu\text{g/mL}$ . A cor rosa indica crescimento bacteriano pela metabolização da resazurina e azul significa

inibição do crescimento bacteriano.

A redução microbiana superior encontrada para o NC-5:5 pode estar relacionada com a maior liberação dos compostos fenólicos apresentada por este material nas primeiras 4 h (Figuras 8 e 9). A redução microbiana inferior encontrada para os NCs 7:3 e 8:2 ocorreu para três dos quatro isolados analisados e, portanto, esta foi considerada a concentração inibitória mínima (CIM). A redução do crescimento microbiano dos NCs é apresentada na tabela 3.

**Tabela 3.** Redução no crescimento de *S. aureus* em diferentes concentrações dos nanocompósitos NC-5:5, NC-7:3 e NC-8:2 (m/m).

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	NC-5:5	NC-7:3	NC-8:2
1250	100	100	100
625	98	97	99
312	92	50	41
156	49	0	34
80	6	0	22
40	1,6	0	2
20	0	0	0
10	0	0	0

Destaca-se que os três NCs mostraram capacidade de redução da atividade microbiana próxima a 100% na concentração de 625  $\mu\text{g/mL}$ . Este resultado permite dizer que a liberação encontrada para os ativos antimicrobianos dos NCs em 24 h foi suficiente para inibir a atividade microbiana naquele período. Entretanto, destaca-se que durante 24 h não houve a liberação total dos ativos da nanoemulsão de macela, conforme mostrado no ensaio de liberação anteriormente descrito (Figuras 8 e 9).

A presença da nanoemulsão de macela nos materiais foi responsável pelas propriedades antimicrobianas, pois não houve inibição bacteriana pelos UNCs (dados

não mostrados). Em um estudo anterior, a CIM encontrada para a nanoemulsão de macela foi equivalente a 30 µg/mL de teor extrativo incorporado na nanoemulsão, o qual continha em torno de 185 µg/mL de 3-O-MQ (Pinheiro Machado et al., 2020a). Semelhantemente, a CIM do extrato hidroalcoólico de macela oriundo da mesma região do utilizado no presente estudo foi 250 µg/mL, o qual continha 1 µg/mL de 3-O-MQ (Fiordalisi, 2018). Esses resultados evidenciam o elevado potencial antimicrobiano da macela em diferentes formas, i.e., extrato, nanoemulsão aquosa e nanoemulsão incorporada em gel. Novos materiais com aplicações farmacêuticas estão sendo desenvolvidos visando opções alternativas de tratamento da mastite bovina, a exemplo do que foi proposto no presente estudo. Nesse sentido, o desenvolvimento de géis a base de carbopol carregados com nanopartículas de cobre foram estudados como novos sistemas antimicrobianos na terapia da mastite causada por *S. aureus* e *E. coli* (Krishna et al., 2017). Os resultados encontrados pelos autores mostraram que o gel formulado possuía atividade de liberação sustentada do ativo antimicrobiano, sendo capaz de contribuir com o desenvolvimento de um gel tópico contra a mastite clínica (Krishna et al., 2017). Outros materiais desenvolvidos a base de polímeros naturais também têm se destacado como agentes antimicrobianos eficazes contra *S. aureus* nas mais diversas áreas, como o nanogel de ácido benzóico-quitosano carregado com óleos essenciais de alecrim o qual mostrou potente atividade antimicrobiana com CIM de 40 µg/mL (Mohsenabadi et al., 2018). A mucilagem de linhaça (Haseeb et al., 2016) e a carragenana (Lesnichaya et al., 2010) usadas como veículos de ativos antimicrobianos também mostraram a manutenção da atividade antimicrobiana contra diversos tipos bacterianos, apresentando diâmetros de halo da zona de inibição de 20 mm e CIM entre 10 e 50 µg/mL, respectivamente. Semelhantemente, o uso empírico da mucilagem de linhaça pós-ordenha, por exemplo, tem sido relatado em sistemas de produção de leite orgânico no Brasil, apresentando potencial anti-séptico (CPRA, 2019; Schiavon, 2011).

No presente estudo, os três NCs mostraram-se adequados como veículos de liberação gradativa dos ativos da nanoemulsão de macela, com destaque para o NC-5:5 que mostrou eficácia superior contra SARM isolados de leite mastítico na análise por microdiluição em caldo. Os NCs desenvolvidos representam novos produtos farmacêuticos sustentáveis com potencial de aplicação em sistemas de controle antimicrobiano. No contexto da terapêutica da mastite bovina durante o período seco, destaca-se que a eficiência das defesas locais da glândula mamária diminui muito

durante a transição funcional da glândula (da lactação à secagem) devido, em parte, a alterações endócrinas, estresses fisiológicos e desequilíbrios energéticos. Este fato colabora para que nos estágios iniciais do período seco as defesas do hospedeiro sejam deficientes devido ao comprometimento da função principal das células de defesa (Sordillo, 2016). Portanto, a aplicação intramamária de um material totalmente natural com potencial antimicrobiano de ação gradativa pode representar uma alternativa promissora para a prevenção e tratamento da mastite neste período.

### **Citotoxicidade dos compósitos não-carregados (UNCs) em células da linhagem MAC-T**

Visando o tratamento da mastite através da aplicação intramamária dos NCs desenvolvidos, os compósitos não carregados (UNCs) foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade via MTT em linhagem celular epitelial mamária bovina (MAC-T). A avaliação de possíveis efeitos citotóxicos da nanoemulsão de macela utilizada no presente estudo foi realizada em estudo prévio no qual os autores destacaram a reduzida toxicidade e o potencial citoprotetor desta nanoemulsão (Pinheiro Machado et al., 2020b). No presente estudo, a viabilidade das células epiteliais mamárias bovinas MAC-T não foi afetada pela exposição aos UNC's. Este ensaio mostrou ausência de toxicidade, pois resultou em uma viabilidade celular próxima de 100%. Esse resultado é significativo, pois sustenta o uso do compósito desenvolvido a base de k-carragenana e mucilagem de linhaça para a liberação de ativos em formulações farmacêuticas. No contexto da terapêutica da mastite bovina, a ausência de toxicidade desse material permite inferir uma redução dos riscos associados ao efeito pró-inflamatório, garantindo segurança na sua indicação de uso intramamário durante o período seco. Destaca-se também que um período seco adequado é necessário para garantir a produção sustentável de leite e que quaisquer situações que interfiram na renovação das células epiteliais durante este período podem ter efeitos prejudiciais no desempenho subsequente da lactação (Sordillo, 2016). Resultados semelhantes aos do presente estudo revelaram que as amostras de compósitos a base de alginato-carragenana com maior concentração polimérica não afetaram a viabilidade da linhagem celular L929 (Popa et al., 2011). A avaliação da citotoxicidade da mucilagem de linhaça também mostrou que esse material permite uma boa viabilidade celular ( $\pm 100\%$ ), reduzindo a viabilidade celular a 82% apenas em exposição à altas concentrações, indicando uma

mínima toxicidade deste material (Haseeb et al, 2019). Uma importante vantagem do uso de compósitos desenvolvidos a base de mucilagem extraída de sementes de plantas tem sido relacionada à biocompatibilidade deste material, o qual tem mostrado inclusive potencial para contribuir com a proliferação celular (Urena-Saborio et al., 2018).

O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento e a caracterização de novos materiais baseados em polímeros de origem natural, k-carragenana e mucilagem de linhaça, com propriedades adequadas para sustentar a sua aplicação como veículos de liberação gradativa da nanoemulsão de macela. Os materiais desenvolvidos apresentaram condição de gel em temperatura próxima a 39° C, sustentaram a liberação prolongada dos ativos antimicrobianos da nanoemulsão e mostraram atividade anti-SARM, associada à ausência de toxicidade em células epiteliais mamárias bovinas. Os resultados encontrados no presente estudo são relevantes para a terapêutica da mastite bovina, principalmente no período seco, e sustentam futuras avaliações *in vivo* dos NCs desenvolvidos.

## **Conclusão**

Os NCs desenvolvidos a base de k-carragenana e mucilagem de linhaça mostraram-se adequados à liberação prolongada dos ativos antimicrobianos da nanoemulsão de macela com atividade anti-SARM *in vitro*. Os NCs representam uma forma farmacêutica sustentável de liberação de ativos antimicrobianos, com potencial de aplicação principalmente em sistemas alternativos de produção leiteira i.e. orgânicos e agroecológicos. Os NCs ainda apresentam as vantagens de serem desenvolvidos totalmente a base de materiais naturais, menos dispendiosos, biodegradáveis e amplamente disponíveis, podendo impactar a saúde, o bem-estar animal e a sustentabilidade da produção leiteira. Destaca-se também que as proporções variadas dos polímeros k-carragenana e mucilagem de linhaça garantiram aos NCs uma variação na viscosidade do produto final, capaz de flexibilizar ainda mais sua aplicação.

## **REFERÊNCIAS**

Algharib, S.A., Dawood, A. and Xie, S., 2020. Nanoparticles for treatment of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Drug delivery*, 27(1), pp.292-308.

Baccari Júnior, F., 1990. Métodos e técnicas de avaliação da adaptabilidade dos animais

às condições tropicais. *Simpósio Internacional de Bioclimatologia Animal nos Trópicos: pequenos e grandes ruminantes*, 1, pp.9-17.

Balestrin, L.A., Bidone, J., Bortolin, R.C., Moresco, K., Moreira, J.C. and Teixeira, H.F., 2016. Protective effect of a hydrogel containing *Achyrocline satureioides* extract-loaded nanoemulsion against UV-induced skin damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 163, pp.269-276.

Bianchi, S.E., Kaiser, S., Pittol, V., Doneda, E., De Souza, K.C.B. and Bassani, V.L., 2019. Semi-preparative isolation and purification of phenolic compounds from *Achyrocline satureioides* (Lam) DC by high-performance counter-current chromatography. *Phytochemical Analysis*, 30(2), pp.182-192.

Campo, V.L., Kawano, D.F., da Silva Jr, D.B. and Carvalho, I., 2009. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis—A review. *Carbohydrate polymers*, 77(2), pp.167-180.

Carini, J.P., Kaiser, S., Ortega, G.G. and Bassani, V.L., 2013. Development, optimisation and validation of a stability-indicating HPLC method of achyrobichalcone quantification using experimental designs. *Phytochemical Analysis*, 24(3), pp.193-200.

Casale LB, Giordani P, Mariotti MG, Malaspina P. 2015. NIR spectroscopy as a tool for discriminating between lichens exposed to air pollution. *Chemosphere*. (134) pp.355-360.

Chen, H.H., XU, S.Y. and Wang, Z., 2004. Rheological properties of flaxseed gum [J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 1.

Chen, H.H., Xu, S.Y. and Wang, Z., 2006. Gelation properties of flaxseed gum. *Journal of food engineering*, 77(2), pp.295-303.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition*. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. USA, 2003.

Costa C, Maraschin M, Rocha M, Specmine: Metabolomics and Spectral Data Analysis and Mining. R package version 1.0. (2015).

CPRA - Centro Paranaense de Referência em Agroecologia. 2019. Sanidade em manejos agroecológicos na bovinocultura de leite. Disponível em: [http://www.cpra.pr.gov.br/arquivos/File/Cartilhas\\_e\\_Folders/cartilhasanidade.pdf](http://www.cpra.pr.gov.br/arquivos/File/Cartilhas_e_Folders/cartilhasanidade.pdf)

Cunningham, J.G.; Klein, B.G. 2008. *Tratado de Fisiologia Veterinária*, 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 770 p.

de Lima, G.G., de Souza, R.O., Bozzi, A.D., Poplawska, M.A., Devine, D.M. and Nugent, M.J., 2016. Extraction method plays critical role in antibacterial activity of propolis-loaded hydrogels. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(3), pp.1248-1257.

Distantina, S., Rochmadi, R., Fahrurrozi, M. and Wiratni, W., 2013. Preparation and characterization of glutaraldehyde-crosslinked kappa carrageenan hydrogel. *Engineering Journal*, 17(3), pp.57-66.

Edlund, U., & Albertsson, A. C. 2008. A microspheric system: hemicellulose-based hydrogels. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 23(2), 171-186.

Erskine, R.J., Wagner, S. and DeGraves, F.J., 2003. Mastitis therapy and pharmacology. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 19(1), pp.109-38.

Esau, K., 1977. Anatomy of seed plants. John Wiley & Sons. Inc. New York, NY, pp.455-500.

Faria, M., Vilela, C., Silvestre, A. J., Deepa, B., Resnik, M., Freire, C. S., & Cordeiro, N. (2019). Physicochemical surface properties of bacterial cellulose/polymethacrylate nanocomposites: An approach by inverse gas chromatography. *Carbohydrate polymers*, 206, 86-93.

Fedeniuk, R.W. and Biliaderis, C.G., 1994. Composition and physicochemical properties of linseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(2), pp.240-247.

Fiordalisi, S.D.A.L., 2018. Potencial de produtos naturais no controle da mastite bovina: teor de fenólicos e flavonoides, atividade antimicrobiana e efeitos sobre células epiteliais mamárias bovina.

Fraser, C. M., Bergeron, J. A., Mays, A., & SE (Ed.) Aiello. 1996. Manual Merck de veterinária: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário. 7ª edição. São Paulo, Roca.

Frey-Wyssling, A. 1976: Mucilages and Gums. In: The plant cell wall, pp, 120-124, Encyclopedia of Plant Anatomy, Gebriider Bomtraeger, Berlin-Stuttgart.

Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X. and Kaltsatos, V., 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced drug delivery reviews*, 50(3), pp.245-259.

Guimarães, J.L., Brito, M.A., Lange, C.C., Silva, M.R., Ribeiro, J.B., Mendonça, L.C., Mendonça, J.F. and Souza, G.N., 2017. Estimate of the economic impact of mastitis: A case study in a Holstein dairy herd under tropical conditions. *Preventive veterinary medicine*, 142, pp.46-50.

Haseeb, M.T., Hussain, M.A., Yuk, S.H., Bashir, S. and Nauman, M., 2016. Polysaccharides based superabsorbent hydrogel from Linseed: Dynamic swelling, stimuli responsive on-off switching and drug release. *Carbohydrate polymers*, 136, pp.750-756.

Haseeb, M.T., Khaliq, N.U., Yuk, S.H., Hussain, M.A. and Bashir, S., 2019. Linseed polysaccharides based nanoparticles for controlled delivery of docetaxel: design, in

vitro drug release and cellular uptake. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 49, pp.143-151.

Hasnain, M.S., Rishishwar, P., Rishishwar, S., Ali, S. and Nayak, A.K., 2018. Isolation and characterization of *Linum usitatissimum* polysaccharide to prepare mucoadhesive beads of diclofenac sodium. *International journal of biological macromolecules*, 116, pp.162-172.

Hébert, A., Sayasith, K., Sénéchal, S., Dubreuil, P. and Lagacé, J., 2000. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS microbiology letters*, 193(1), pp.57-62.

Kanmani, P. and Rhim, J.W., 2014. Development and characterization of carrageenan/grapefruit seed extract composite films for active packaging. *International journal of biological macromolecules*, 68, pp.258-266.

Khalil, H.A., Saurabh, C.K., Tye, Y.Y., Lai, T.K., Easa, A.M., Rosamah, E., Fazita, M.R.N., Syakir, M.I., Adnan, A.S., Fizree, H.M. and Aprilia, N.A.S., 2017. Seaweed based sustainable films and composites for food and pharmaceutical applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 77, pp.353-362.

Knorst, M.T., 1991. Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *Compositae* (marcela).

Krishna, A.N., Reddy, M.V.Y., Reddy, M.C.B. and Padmini, I., 2017. Formulation, Evaluation of Nano Copper Gel For Treatment of Clinical Mastitis. *J Pharm Res*, 11, pp.554-7.

Kuhnen, S.; Ogliari, J. B.; Dias, P. F.; Boffo, E. F.; Correia, I.; Ferreira, A. G.; Delgadillo, I.; Maraschin, M. ATRFTIR spectroscopy and chemometric analysis applied to discrimination of landrace maize flours produced in southern Brazil. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 45, p.1673–1681 1673, 2010(a).

Kuhnen, S.; Ogliari, J. B.; Dias, P. F.; Santos, M. S.; Ferreira, A. G.; Bonham, C. C.; Wood, K. V.; Maraschin, M. Metabolic Fingerprint of Brazilian Maize Landraces Silk (Stigma/Styles) Using NMR Spectroscopy and Chemometric Methods. *Journal Agric. Food Chem*, v. 58, p 2194-2200, 2010(b).

Lanctôt, S., Fustier, P., Taherian, A.R., Bisakowski, B., Zhao, X. and Lacasse, P., 2017. Effect of intramammary infusion of chitosan hydrogels at drying-off on bovine mammary gland involution. *Journal of dairy science*, 100(3), pp.2269-2281.

Langoni, H., Salina, A., Oliveira, G. C., Junqueira, N. B., Menozzi, B. D., & Joaquim, S. F. 2017. Considerations on the treatment of mastitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(11), 1261-1269.

Lesnichaya, M.V., Aleksandrova, G.P., Feoktistova, L.P., Sapozhnikov, A.N., Fadeeva, T.V., Sukhov, B.G. and Trofimov, B.A., 2010. Silver-containing nanocomposites based

on galactomannan and carrageenan: synthesis, structure, and antimicrobial properties. *Russian Chemical Bulletin*, 59(12), p.2323.

Locatelli, C., Cremonesi, P., Caprioli, A., Carfora, V., Ianzano, A., Barberio, A., Morandi, S., Casula, A., Castiglioni, B., Bronzo, V. and Moroni, P., 2017. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy cattle herds, related swine farms, and humans in contact with herds. *Journal of dairy science*, 100(1), pp.608-619.

Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B., 1970. The ultraviolet spectra of flavones and flavonols. In *The systematic identification of flavonoids* (pp. 41-164). Springer, Berlin, Heidelberg.

Makino, K., Idenuma, R., Murakami, T. and Ohshima, H., 2001. Design of a rate-and time-programming drug release device using a hydrogel: pulsatile drug release from  $\kappa$ -carrageenan hydrogel device by surface erosion of the hydrogel. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 20(4), pp.355-359.

Maraschin, M.; Somensi-Zegio, A.; Oliveira, S. K.; Kuhnen, S. Tomazzoli, M. M.; Raqzzoni, J. C.; Zeri, A. C.; Carreira, R.; Correia, R.; Costa, C.; Rocha, M. 2015. Metabolic profiling and classification of propolis samples from southern Brazil: an NMR-based platform coupled with machine learning. *Journal of Natural Products*, v.79, p.13-23.

Maraschin M, Somensi-Zeggio A, Oliveira SK, Kuhnen S, Tomazzolli MM, Raguzzoni JC, Zeri ACM, Carreira R, Correia S, Costa C, Rocha M. 2016. Metabolic Profiling and Classification of Propolis Samples from Southern Brazil: An NMR-Based Platform Coupled with Machine Learning. *J. Nat Prod.* 79:13-23.

Mohsenabadi, N., Rajaei, A., Tabatabaei, M. and Mohsenifar, A., 2018. Physical and antimicrobial properties of starch-carboxy methyl cellulose film containing rosemary essential oils encapsulated in chitosan nanogel. *International journal of biological macromolecules*, 112, pp.148-155.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), pp.55-63.

Muhamad, I.I., Lazim, N.A.M. and Selvakumaran, S., 2019. Natural polysaccharide-based composites for drug delivery and biomedical applications. In *Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications* (pp. 419-440). Academic Press.

Mujtaba, M., Akyuz, L., Koc, B., Kaya, M., Ilk, S., Cansaran-Duman, D., Martinez, A.S., Cakmak, Y.S., Labidi, J. and Boufi, S., 2019. Novel, multifunctional mucilage composite films incorporated with cellulose nanofibers. *Food Hydrocolloids*, 89, pp.20-28.

Naran, R., Chen, G. and Carpita, N.C. (2008). Novel Rhamnogalacturonan I and Arabinoxylan Polysaccharides of Flax Seed Mucilage1 [C][OA].

Orellano, M.S., Isaac, P., Breser, M.L., Bohl, L.P., Conesa, A., Falcone, R.D. and Porporatto, C., 2019. Chitosan nanoparticles enhance the antibacterial activity of the native polymer against bovine mastitis pathogens. *Carbohydrate polymers*, 213, pp.1-9.

Parisotto, G. et al., 2007. Determinação do número de acidez total em resíduo de destilação atmosférica e de vácuo do petróleo empregando a espectroscopia no infravermelho (ATR-FTIR) e calibração multivariada. Santa Maria, RS. Dissertação de mestrado.

Patel, A., Gohel, M., Soni, T., Hingirani, L., Patel, N., & Baldaniya, L. (2014). Demonstration of Multivariate Data Analysis for the Development of nanoemulsions containing Active Herbal Principle of *Boswellia serrata* for Topical Application. *Int. J. Drug Deliv.*, 6, 359-372.

Pinheiro Machado et al., 2020a. Formulation and evaluation of anti-MRSA nanoemulsion loaded with *Achyrocline satureioides*: a new sustainable strategy for the bovine mastitis. *Nano Ex.* <https://doi.org/10.1088/2632-959X/abbcac>.

Pinheiro Machado et al., 2020b. Mammary glandular epithelial permeation studies and protective cellular effects of innovative *Achyrocline satureioides* extract nanoemulsions. Artigo em processo de publicação.

Popa, E.G., Gomes, M.E. and Reis, R.L., 2011. Cell delivery systems using alginate–carrageenan hydrogel beads and fibers for regenerative medicine applications. *Biomacromolecules*, 12(11), pp.3952-3961.

Pouran, H., Colodrero, R. P., Wu, S., Hix, G., Zakharova, J., & Zhang, H. 2020. Assessment of ATR-FTIR spectroscopy with multivariate analysis to investigate the binding mechanisms of Ag and TiO<sub>2</sub> nanoparticles to Chelex®-100 or Metsorb™ for the DGT technique. *Analytical Methods*, 12(7), 959-969.

Puttipipatkachorn, S., Nunthanid, J., Yamamoto, K. and Peck, G.E., 2001. Drug physical state and drug–polymer interaction on drug release from chitosan matrix films. *Journal of controlled release*, 75(1-2), pp.143-153.

Radostits, O. M., Mayhew, I. G., & Houston, D. M. 2007. *Veterinary clinical examination and diagnosis*. WB Saunders.

Rencher, A.C. 2002. *Methods of Multivariate Analysis*. A John Wiley & Sons, Inc. Publications p.727. 2ed.

Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. and Leonard, F.C., 2005. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Artmed Editora.

R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, (2010).

Retta, D., Dellacassa, E., Villamil, J., Suárez, S.A. and Bandoni, A.L., 2012. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review. *Industrial Crops and Products*, 38, pp.27-38.

- Sahota, A., 2009. The global market for organic food & drink. *The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends, 2009*, pp.59-64.
- Sandasi, M., Leonard, C.M. and Viljoen, A.M., 2010. The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in applied microbiology*, 50(1), pp.30-35.
- Sarker, S.D., Nahar, L. and Kumarasamy, Y., 2007. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42(4), pp.321-324.
- Schiavon, D. B. A. (2011). *Aplicação de um fitoterápico a base de Tagetes minuta na anti-sepsia de tetos de vacas pós-ordenha* (Master's thesis, Universidade Federal de Pelotas).
- Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M.A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Hosseini, S.M. and Khaksar, R., 2014a. Characterization of  $\kappa$ -carrageenan films incorporated plant essential oils with improved antimicrobial activity. *Carbohydrate polymers*, 101, pp.582-591.
- Shojaee-Aliabadi, S., Mohammadifar, M.A., Hosseini, H., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Hosseini, S.M., Haghshenas, M. and Khaksar, R., 2014b. Characterization of nanobiocomposite kappa-carrageenan film with *Zataria multiflora* essential oil and nanoclay. *International journal of biological macromolecules*, 69, pp.282-289.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), pp.144-158.
- Sordillo, L. M. (2016). Physiology of the mammary gland at dry-off: What do we really know?. *Tieraerztliche Umschau*, 71(3), 51-+.
- Spinosa, H. D. S., Górnaiak, S. L., & Bernardi, M. M. (2011). *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 5.ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Spohr, M., Rau, J., Friedrich, A., Klittich, G., Fetsch, A., Guerra, B., Hammerl, J.A. and Tenhagen, B.A., 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in three dairy herds in southwest Germany. *Zoonoses and Public Health*, 58(4), pp.252-261.
- Tapia, C., Escobar, Z., Costa, E., Sapag-Hagar, J., Valenzuela, F., Basualto, C., Gai, M.N. and Yazdani-Pedram, M., 2004. Comparative studies on polyelectrolyte complexes and mixtures of chitosan–alginate and chitosan–carrageenan as prolonged diltiazem clorhydrate release systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), pp.65-75.
- Urena-Saborio, H., Alfaro-Viquez, E., Esquivel-Alvarado, D., Madrigal-Carballo, S. and Gunasekaran, S., 2018. Electrospun plant mucilage nanofibers as biocompatible scaffolds for cell proliferation. *International journal of biological macromolecules*, 115, pp.1218-1224.

Vanegas, J.S., Torres, G.R. and Campos, B.B., 2019. Characterization of a  $\kappa$ -Carrageenan Hydrogel and its Evaluation as a Coating Material for Fertilizers. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(4), pp.774-783.

Ziolkowska, A., 2012. Laws of flaxseed mucilage extraction. *Food hydrocolloids*, 26(1), pp.197-204.

## DISCUSSÃO GERAL

Com o objetivo de desenvolver um produto inovador baseado principalmente em produtos naturais, a presente tese envolveu estudos fitoquímicos e tecnológicos, em um trabalho multidisciplinar. Os resultados encontrados mostraram que a macela (*Achyrocline satureioides*) associada a sistemas nanoemulsionados são materiais estáveis, com reduzido tamanho de partícula (200 nm) e com alta eficiência de encapsulação (>94%) dos compostos ativos, o que conferiu um potencial biológico aprimorado e proteção aos ativos. O método utilizado, *i.e.*, homogeneização de alta pressão, no desenvolvimento das nanoemulsões de macela tem sido considerado muito eficaz no desenvolvimento de nanoformulações, pois apresenta vantagens como: baixa polidispersidade, melhor dispersão de formulações com alta concentração de lipídios, evita o uso de solventes orgânicos e, principalmente, possibilita o aumento de escala para produção industrial (Mistry et al., 2012).

As nanoemulsões de macela mostraram elevada atividade antimicrobiana e potencial antibiofilme contra SARM isolados de leite mastítico, com baixa toxicidade e potencial citoprotetor em células epiteliais da glândula mamária bovina (MAC-T). Uma nanoemulsão em especial se destacou, NE-ML1:5, por apresentar maior ação antimicrobiana quando comparada às demais formulações e ao extrato de macela. Nesse contexto, destaca-se que ao desenvolver um produto nanoestruturado espera-se que novas características sejam também desenvolvidas, o que representa uma vantagem desta tecnologia. Os resultados encontrados evidenciaram a importância da condução de estudos de otimização de nanoformulações visando à melhor combinação de ingredientes (óleos, surfactantes e ativos), em termos de composição e proporção destes materiais. Esta nanoemulsão de macela mais promissora, NE-ML1:5, foi selecionada para os estudos subsequentes, os quais evidenciaram também a maior capacidade de penetração desta formulação em tecido de explantes mamários bovinos e a redução da morte celular apoptótica e necrótica das células epiteliais após injúria oxidativa.

Apesar dos resultados encontrados mostrarem o maior potencial antimicrobiano das nanoemulsões, as diferenças encontradas nos valores de MIC entre as formulações em geral e o extrato de macela não foram muito evidentes. Nesse sentido, sugere-se que ao otimizar o desenvolvimento de nanoformulações, maior

atenção seja dada ao tamanho de partícula obtido. Outros estudos mostraram que melhores resultados de atividade antimicrobiana podem ser encontradas quando tamanhos de partículas ainda mais reduzidos, em torno de 50 – 10 nm são alcançados (El-Sayed e Kamel, 2020). Entretanto, é fundamental que se leve em consideração a aplicação desejada, uma vez que quanto menor o tamanho das partículas, maiores são os riscos de toxicidade. Para a aplicação de nanoestruturas no contexto das terapêuticas da mastite bovina deve-se buscar um equilíbrio entre atividade antimicrobiana e toxicidade celular, considerando, principalmente as células epiteliais, para não comprometer a produção leiteira.

Ainda em termos de comparação, maiores vantagens foram evidenciadas em relação à encapsulação/proteção dos ativos e ao ensaio de permeação, nos quais a nanoemulsão com o extrato de macela mostrou elevada taxa de encapsulação e maior capacidade de penetração em explantes mamários bovinos. Estes resultados para a terapêutica intramamária da mastite bovina podem ser muito relevantes por permitir um maior alcance e liberação controlada dos ativos antimicrobianos nos locais doentes. Destaca-se que no desenvolvimento de nanoestruturas, elevadas encapsulações têm sido consideradas fundamentais para que melhores respostas biológicas sejam alcançadas.

Dentre as formulações desenvolvidas, a nanoemulsão de macela mais promissora selecionada (NE-ML1:5) foi posteriormente incorporada em compósitos hidrogéis para a adequação da sua viscosidade visando a liberação prolongada dos ativos antimicrobianos para a aplicação intramamária com foco no período seco. De fato, os resultados esperados foram alcançados, mostrando que os compósitos hidrogéis desenvolvidos a base de k-carragenana e mucilagem de linhaça, com destaque para o compósito formulado com a mesma proporção de k-carragenana e mucilagem de linhaça (5:5), foram sistemas eficazes de liberação gradativa dos ativos antimicrobianos da nanoemulsão. O nanocompósito 5:5 mostrou liberação inicial dos ativos mais rápida e sustentada ao longo de 72 horas, o que pode ter influenciado na maior atividade antimicrobiana encontrada para este material. É importante destacar que os compósitos hidrogéis desenvolvidos com os polímeros naturais k-carragenana e mucilagem de linhaça apresentaram características promissoras capazes de ampliar ainda mais a sua aplicação, por exemplo, associando esses materiais a outros compostos antimicrobianos

como o extrato de macela, outros extratos vegetais ou até mesmo com outros sistemas nanoestruturados.

Em conjunto, no presente estudo foram desenvolvidos materiais inovadores que representam formas farmacêuticas sustentáveis para o tratamento intramamário da mastite bovina, contemplando principalmente sistemas alternativos de produção, como o orgânico e o agroecológico. Espera-se que estudos de desenvolvimento dessa natureza sejam capazes de impactar a saúde, o bem-estar animal e a sustentabilidade da produção leiteira. Dentre as estratégias avaliadas, a nanoemulsão de macela tanto na forma líquida quanto incorporada em compósito hidrogel destacou-se como um eficaz antimicrobiano. A formulação líquida, i.e., nanoemulsão parece ser mais adequada para uso intramamário durante a lactação por estar em uma forma mais prontamente disponível. Já os compósitos carregados com a nanoemulsão de macela, i.e., nanocompósitos parecem mais adequados para uso intramamário no período improdutivo (período seco) por permitirem a liberação gradual dos ativos. Destaca-se que estes materiais podem ter a avaliação do seu uso ampliada para outros sistemas de controle microbiano. Diante dos resultados encontrados, o potencial antimicrobiano combinado à baixa citotoxicidade e à capacidade citoprotetora da nanoemulsão de macela garantem a sua eficácia e segurança para futuras avaliações do seu uso *in vivo*. Sugere-se também novos estudos de otimização da nanoemulsão visando aumentar ainda mais a concentração do teor extrativo e reduzir o tamanho de partícula. Diante do potencial evidenciado para a nanoemulsão de macela, novas propostas de uso devem ser consideradas, a exemplo da sua incorporação em filmes poliméricos desenvolvidos a base de acetato de polivinila (PVA) ou outros, visando um produto selante com ação desinfetante para uso pós-ordenha (pós-dipping).

De maneira geral, a mastite bovina é a principal causa de perdas econômicas na atividade leiteira em todo o mundo. O uso de antimicrobianos tem sido o tratamento mais comum em rebanhos leiteiros, mas a resistência microbiana se tornou um sério problema de saúde pública. Como consequência, o uso inadequado de antimicrobianos nos sistemas de produção de alimentos é um assunto discutido criticamente, que evidencia a necessidade urgente de substituir o uso de antibióticos por alternativas mais eficazes e que não comprometam a saúde em geral. Produtos naturais, principalmente na forma de extratos nanoencapsulados têm se mostrado promissores para o

desenvolvimento de formas farmacêuticas antimicrobianas candidatas ao uso no tratamento e prevenção da mastite bovina, especialmente em sistemas de produção de leite orgânico e agroecológico.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os produtos desenvolvidos são candidatos para avaliação *in vivo* na terapêutica da mastite bovina, uma vez que a nanoemulsão de macela e os hidrogéis de k-carragenana e mucilagem de linhaça carregados com a nanoemulsão, i.e., nanocompósitos, representam materiais inovadores desenvolvidos a base de produtos naturais.

Destaca-se que o tratamento intramamário da mastite bovina pelo uso dos materiais desenvolvidos pode atender às demandas dos diversos sistemas de produção leiteira, como o convencional, o orgânico e o agroecológico.

Espera-se que estudos dessa natureza sejam ainda capazes de impactar a saúde, o bem-estar social, o bem-estar animal e a sustentabilidade da produção leiteira.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Em função do tamanho reduzido dos artigos parte da metodologia será detalhada nesse material suplementar, incluindo também algumas figuras e fotos dos resultados encontrados no desenvolvimento das nanoemulsões e nas avaliações da atividade antimicrobiana e antibiofilme. Detalhes do desenvolvimento inicial de nanoemulsões de óleo de linhaça para posterior incorporação do extrato de macela e avaliações biológicas estão descritos a seguir.

### Desenvolvimento das nanoemulsões

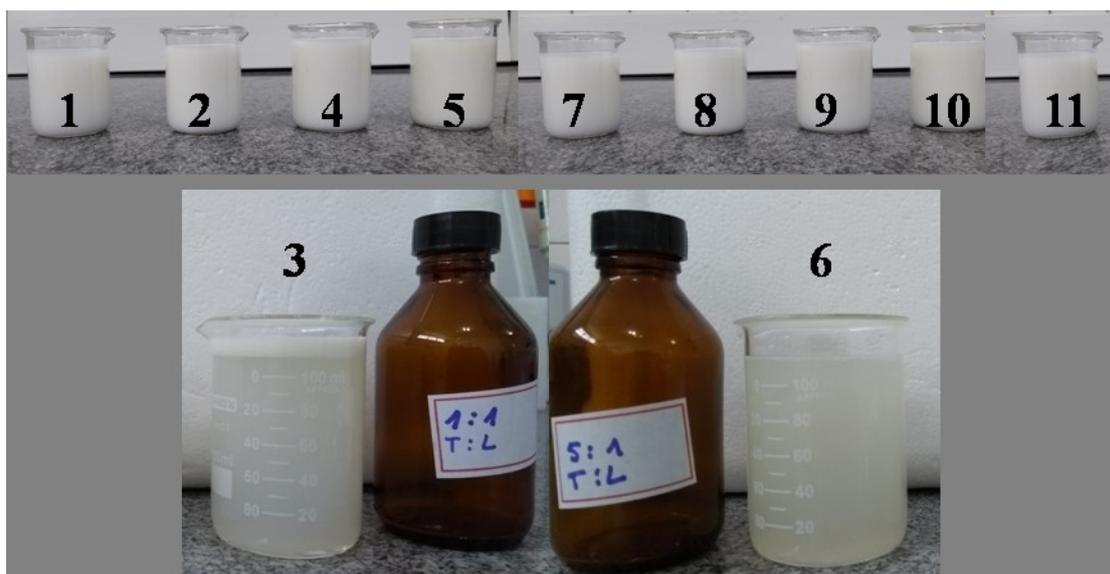
#### *Estudo de desenvolvimento e otimização das nanoemulsões de linhaça (NE-L)*

As nanoemulsões foram preparadas pelo método de homogeneização por alta pressão. Visando aperfeiçoar as condições de preparação das nanoemulsões de linhaça (NE-L) foram preparadas formulações variando as concentrações de óleo de linhaça (Destilaria Bauru Lote nº DBPZRS-LNHDRPF47119-4) e surfactante Tween 80 (Sigma Aldrich). Para isto, a fase aquosa foi vertida lentamente na fase oleosa composta por diferentes concentrações de óleo (1, 5 e 10 w/v) e diferentes concentrações de surfactante tween 80 (1, 5 e 10 w/v) sob agitação magnética moderada por 20 minutos. Após, a pré-emulsão foi transferida para um homogeneizador de alta pressão (Homolab, FBF Itália, Sala Baganza (Parma) – Itália) e homogeneizadas a 500 bar por três ciclos. A Tabela 1MS mostra as condições de preparação das diferentes formulações desenvolvidas. A Figura 1MS mostra o aspecto macroscópico das formulações. A Tabela 2MS mostra a caracterização físico-química das formulações desenvolvidas (NE-L1-11).

**Tabela 1MS.** Nanoemulsões-linhaça NE-L obtidas pelo método de homogeneização por alta pressão.

<b>Composição (mg mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>	<b>L4</b>	<b>L5</b>	<b>L6</b>	<b>L7</b>	<b>L8</b>	<b>L9</b>	<b>L10</b>	<b>L11</b>
Óleo de linhaça	10	10	10	50	100	10	50	100	10	50	100
Tween 80	1	2	10	10	10	50	50	50	100	100	100
Água (q.s.p)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

**Figura 1MS.** Aspecto macroscópico das nanoemulsões-linhaça inicialmente desenvolvidas (NE-L1-11). L3 e L6 apresentaram separação de fases.



**Tabela 2MS.** Valores de tamanho de partícula (nm), índice de polidispersão (PdI), potencial zeta (PZ) e pH das nanoemulsões-linhaça NE-L.

Parâmetros	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11
Nm	256,4	250,7	-	230,4	190,8	-	214,2	202,0	197,8	202,9	195,5
PdI	0,28	0,22	-	0,25	0,18	-	0,21	0,22	0,19	0,20	0,25
PZ (mV)	-40,2		-	-31,5	-32,7	-	-30,0	-27,6	-23,7	-25,5	-24,9
pH	5,2		-	5,6	5,6	-	5,6	5,6	5,6	5,6	5,7

\*As formulações L3 e L6 apresentaram separação de fases logo após o desenvolvimento.

Destas, foram selecionadas em função da sua composição 4 formulações-base (L2, L4, L7 e L8) para a incorporação do extrato de macela em diferentes concentrações (n=10).

### **Preparação das nanoemulsões de linhaça contendo extrato de macela NE-ML**

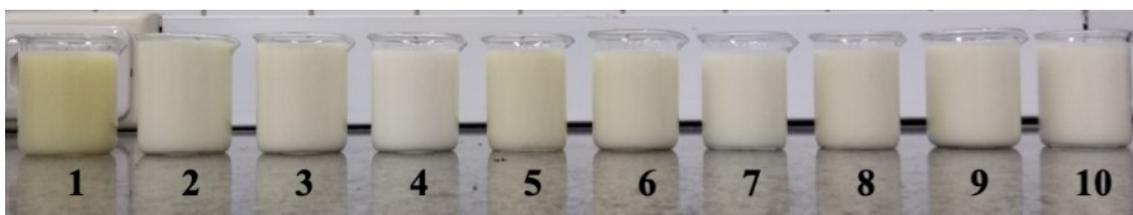
As nanoemulsões de linhaça contendo extrato de macela (NE-ML) foram preparadas por homogeneização por alta pressão, usando as condições de preparação descritas no estudo de desenvolvimento e otimização das nanoemulsões de linhaça NE-L. Com base nos resultados desse estudo, as formulações L2, L4, L7 e L8 foram selecionadas. Para

obter as nanoemulsões contendo o extrato de macela NE-ML, soluções extrativas que foram previamente submetidas à evaporação sob pressão reduzida para remover o solvente extrator, foram incorporadas às nanoemulsões de linhaça NE-L, conforme metodologia descrita anteriormente. O extrato de macela foi então adicionado à fase oleosa em diferentes concentrações (20, 15 e 5%, v/v) para cada formulação e as nanoemulsões foram preparadas vertendo a fase aquosa na fase oleosa. A Tabela 3MS mostra as condições de preparação das diferentes NE-ML desenvolvidas. A figura 2MS mostra o aspecto macroscópico das formulações desenvolvidas (NE-ML1-10).

**Tabela 3MS.** NE-ML (1-10) obtidas pelo método de homogeneização por alta pressão, preparadas com 20%, 15% e 5% (v/v) de extrato.

<b>Composição</b> (mg mL <sup>-1</sup> )	<b>ML1</b>	<b>ML2</b>	<b>ML3</b>	<b>ML4</b>	<b>ML5</b>	<b>ML6</b>	<b>ML7</b>	<b>ML8</b>	<b>ML9</b>	<b>ML10</b>
Óleo de linhaça	10	50	50	50	50	50	50	100	100	100
Tween 80	2	10	10	10	50	50	50	50	50	50
Extrato de macela	2,5	0,6	1,8	2,5	0,6	1,8	2,5	0,6	1,8	2,5
Água (q.s.p)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

**Figura 2MS.** Aspecto macroscópico das nanoemulsões-macela desenvolvidas (NE-ML1-10).



**Tabela 4MS.** Propriedades físico-químicas das nanoemulsões-macela NE-ML obtidas pelo método de homogeneização por alta pressão.

<b>Parâmetros</b>	<b>ML1</b>	<b>ML2</b>	<b>ML3</b>	<b>ML4</b>	<b>ML5</b>	<b>ML6</b>	<b>ML7</b>	<b>ML8</b>	<b>ML9</b>	<b>ML10</b>
Nm	242,3	244,4	237,0	237,9	217,4	212,3	219,0	211,5	242,5	207,5
PdI	0,18	0,20	0,17	0,21	0,19	0,19	0,21	0,25	0,15	0,25
PZ (mV)	-37,8	-44,9	-41,8	-30,4	-38,9	-36,9	-27,2	-36,0	-38,5	-35,1
pH	5,3	4,8	4,8	4,9	4,6	4,7	4,9	4,7	4,7	5,0

Assim, das 10 formulações desenvolvidas foram selecionadas para estudos posteriores as 4 formulações com maiores teores de extrato de macela que mantiveram-se estáveis e

apresentaram as características físico-químicas desejadas (NE-ML1,4,7,10). A tabela 3MS mostra a composição das formulações selecionadas desenvolvidas contendo o extrato de macela NE-ML1,4,7,10. A figura 3MS mostra o aspecto macroscópico das formulações.

**Tabela 5MS.** Composição das nanoemulsões-macela ML selecionadas desenvolvidas pelo método de homogeneização por alta pressão (HAP).

<b>Composição (mg mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>ML1</b>	<b>ML4</b>	<b>ML7</b>	<b>ML10</b>
Óleo de linhaça	10	50	50	100
Tween 80	2	10	50	50
Extrato de macela	2,5	2,5	2,5	2,5
Água (q.s.p)	100	100	100	100

**Figura 3MS.** Aspecto macroscópico das nanoemulsões-macela selecionadas e suas respectivas nanoemulsões-linhaça (NE-L e NE-ML 1, 4, 7, 10).



### **Atividade antimicrobiana *in vitro***

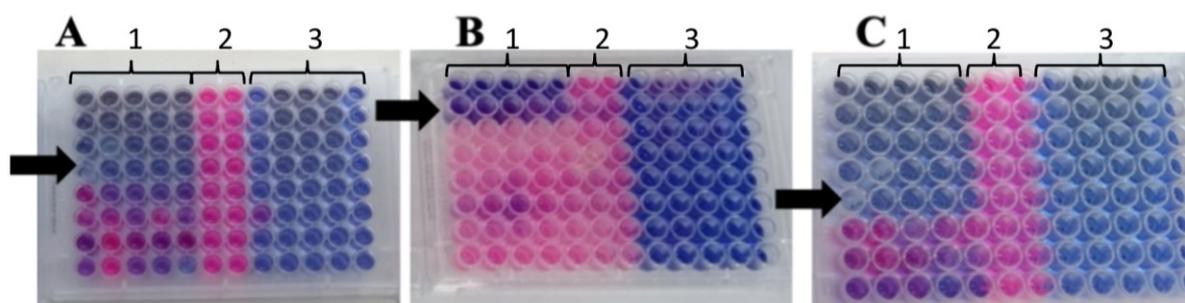
#### ***Bactérias planctônicas***

As NE-L e NE-ML foram testadas contra uma cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923 e ATCC metilina-resistente 33592 e seis isolados de leite mastítico resistentes à metilina (SAMR) coletados no sul do Brasil pertencentes à Bacterioteca do Laboratório Integrado de Bioquímica e Produtos Naturais.

Para avaliar a atividade antimicrobiana das NE-L e NE-ML contra bactérias planctônicas foi utilizado o método de microdiluição em caldo (The Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016). Para cada NE-L foram testadas oito diferentes concentrações variando de 50 a 0,38% (v/v) contra cada isolado (n = 8). Para cada NE-ML foram testadas também oito diferentes concentrações, variando de 10 a 0,78% (v/v).

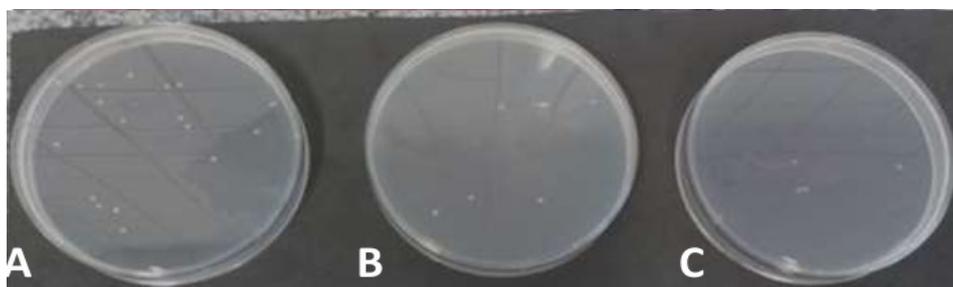
Diluições das nanoemulsões foram preparadas em 100  $\mu\text{L}$  de caldo Muller-Hinton. A densidade populacional inicial do inóculo foi padronizada através do controle de turbidez equivalente a uma solução padrão de McFarland 0,5 (contendo  $10^7$  a  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ). Após diluição, 10  $\mu\text{L}$  do padrão de inóculo bacteriano correspondendo a  $10^5$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  foram adicionados aos poços das microplacas e incubados à 37 °C por 24 h. Para comparação, os veículos utilizados na preparação das formulações foram testados nas mesmas concentrações, assim como o óleo de linhaça e o extrato bruto de macela. A concentração inibitória mínima CIM50 e CIM90 (Schwarz et al., 2010) foi determinada como aquela concentração que não apresentou crescimento visível, a qual foi confirmada pela adição de 50  $\mu\text{L}$  do corante resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3 ona 10-óxido) ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Neste caso, as células metabolicamente ativas são capazes de reduzir a resazurina de coloração azul à resorufina de coloração rosa. Essa redução é proporcional ao número de células metabolicamente ativas existentes.

**Figura 4MS.** Imagem representativa da ação da resazurina indicando a CIM da nanoemulsão de macela (A), do óleo de linhaça (B) e do extrato de macela (C). 1=caldo + ativo + inóculo; 2=caldo + inóculo; 3=controle negativo caldo + ativo e apenas caldo.



Adicionalmente, uma alíquota do conteúdo dos poços foi retirada e semeada em placa de Petri estéril contendo ágar BHI. O re-plaqueamento foi realizado nos poços da concentração que a adição da resazurina não revelou crescimento bacteriano (CIM) bem como das duas concentrações acima, quando possível. As placas foram incubadas por 24 h à  $35 \pm 0,2^\circ\text{C}$  (Figura 5MS). Após esse período, o número de colônias em cada uma das placas foi determinado e a redução do crescimento bacteriano foi calculada comparando-se o crescimento bacteriano que indicou ação bacteriostática com o controle inicial do inóculo (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) (Smith-Palmer, Stewart e Fyfe, 1998).

**Figura 5MS.** Imagem representativa do re-plaqueamento dos poços correspondentes a concentração em que a adição da resazurina não revelou crescimento bacteriano (CIM; A) bem como das duas concentrações acima, respectivamente (B e C).



### ***Atividade antibiofilme***

Com base nos resultados das propriedades físico-químicas do estudo de estabilidade e da CIM, a formulação NE-ML4 constituída de 2,5 mg mL<sup>-1</sup> de extrato de macela, 10 mg mL<sup>-1</sup> de tween e 50 mg mL<sup>-1</sup> de óleo de linhaça, foi selecionada para ser utilizada nos ensaios antibiofilme *in vitro*.

### ***Avaliação da formação de biofilme***

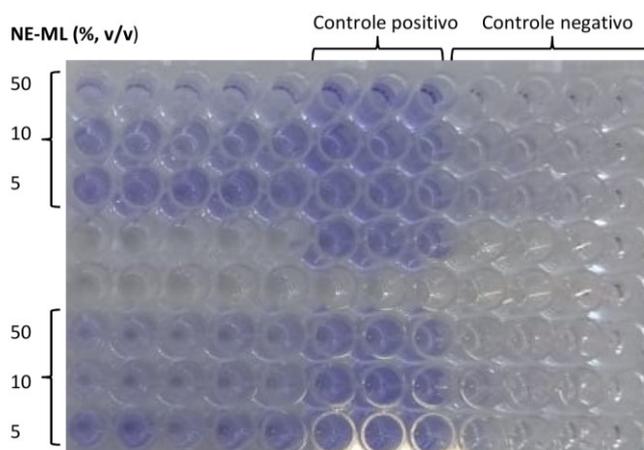
Inicialmente, a cepa padrão ATCC 25923 de *S. aureus* e isolados de SAMR (Tabela 3) de leite mastítico (n=8) foram avaliadas quanto a formação de biofilme em microplaca de 96 poços de acordo com a metodologia descrita por Stepanovic et al. (2007) com modificações. Para isso, estas foram incubadas em caldo triptona de soja (TSB - Tryptic Soy Broth) suplementado com 1% de glicose à 35 °C. Após 24 h, a cultura foi diluída em meio TSB para aproximadamente 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC, equivalente a 0,5 na escala de MacFarland. Uma alíquota de 200 µL da cultura foi semeada em quadruplicata em microplacas de 96 poços. Poços contendo apenas TSB foram considerados como controle negativo. As placas foram então incubadas por 48 h, e posteriormente lavadas três vezes com PBS estéril (pH 7,4) e secas à temperatura ambiente. Aos poços foi adicionado metanol (200 µL), por 15 minutos, para posterior coloração com cristal violeta (2% m v<sup>-1</sup>). Após 20 min, as placas foram lavadas uma vez com PBS para a remoção do excesso de corante e 200 µL de ácido acético 33% foi adicionado. Uma alíquota (150 µL) foi transferida para uma nova placa para a leitura da densidade óptica à 570 nm (Babsystems, MultiSkan EX). Os isolados foram então classificados se OD ≤ OD<sub>c</sub> = não produzem biofilme; OD<sub>c</sub> < OD ≤ 2xOD<sub>c</sub> = fracas produtoras de biofilme;

$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$  = moderadas produtoras de biofilme;  $4 \times OD_c < OD$  = fortes produtoras de biofilme. Para a determinação da atividade antibiofilme da formulação NE-ML4, foram selecionadas as linhagens fortes e moderadas produtoras de biofilme (n= 4) além da ATCC 25923.

### ***Prevenção da formação de biofilme***

De acordo com os passos descritos acima, a cultura de *S. aureus* cultivada em 48 h foi diluída em caldo de tripsona de soja (TSB) fresco na concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC (0,5 escala MacFarland). Uma alíquota (200  $\mu$ l) de cultura diluída foi adicionada à microplaca. Diferentes concentrações da NE-ML4 (25, 10 e 5% v/v) foram adicionadas aos poços com e sem inóculo. Foram incluídos nos testes os controles negativos (caldo TSB) e positivo (inóculo sem adição de NE-ML4). A placa foi incubada à  $35 \pm 0,2$  °C por 48 h. As lavagens e a coloração foram feitas pelo método mencionado anteriormente.

**Figura 6MS.** Imagem ilustrativa da etapa de coloração dos biofilmes expostos concomitantemente à nano-emulsão macela nas concentrações de 50, 10, 5 % v/v. Controle + = controle do inóculo; Controles - = controle da nanoemulsão e do meio.



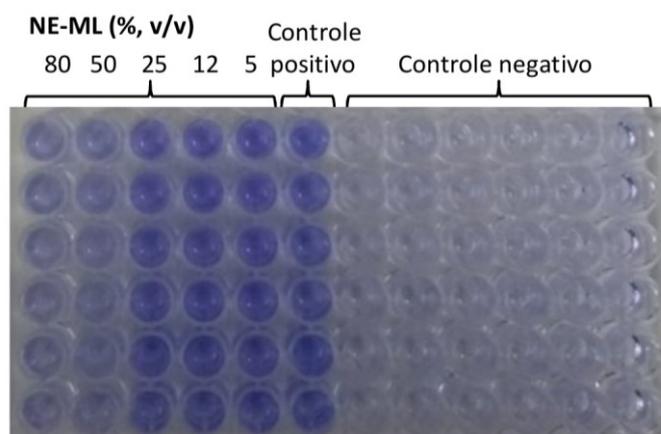
A percentagem de inibição do crescimento do biofilme foi determinada pela leitura da absorbância à 570 nm utilizando um leitor de microplacas (SpectraMax® 190 Microplate Reader from Molecular Devices Corp.) e através da seguinte fórmula: IB (%) =  $[1 - (AT / AI) \times 100$ , onde IB é a inibição do crescimento de biofilme, AT é a absorbância média das concentrações de nanoemulsão testadas com inóculo subtraído do valor de absorbância das mesmas concentrações de nanoemulsão sem a adição de inóculo e AI é a absorbância média do controle crescimento de biofilme. A

concentração mínima inibitória do biofilme (CMIB) foi considerada como a concentração na qual a absorbância  $\leq$  controle negativo (Pettit et al., 2005; Sandoe et al., 2006).

### ***Erradicação do biofilme formado***

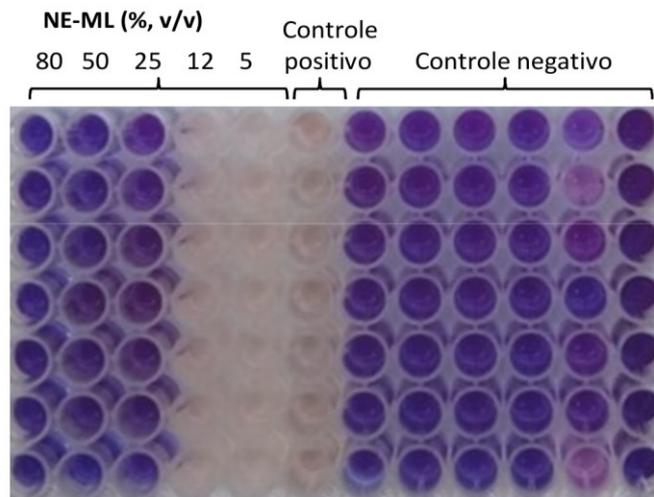
A atividade antibiofilme foi avaliada em biofilme pré-formado por 48 h. Depois desse período, o meio de cultura dos poços contendo biofilme foi removido e imediatamente trocado por meio novo (controle) ou por meio contendo diferentes concentrações (80, 50, 25, 12 e 5% v/v) da formulação NE-ML4. Um controle negativo contendo somente meio foi também incluído nos testes. Os biofilmes foram reincubados por 24 h à 35°C e posteriormente corados com cristal violeta (2%). A absorbância foi então medida conforme descrito anteriormente.

**Figura 7MS.** Imagem ilustrativa da etapa de coloração dos biofilmes pré-formados visando a sua erradicação após exposição à nanoemulsão de macela nas concentrações de 80, 50, 25, 12 e 5% v/v.



A concentração em que os biofilmes já estabelecidos apresentaram remoção  $\geq 70\%$  do fundo dos poços tratados foi determinada como a concentração mínima de erradicação de biofilme CMEB (Muli and Struthers 1998; Ceri et al. 1999). A CMEB foi confirmada também pela adição do corante resazurina para possibilitar uma correlação entre a biomassa do biofilme com a atividade metabólica das células bacterianas viáveis. Os resultados foram expressos como porcentagem.

**Figura 8MS.** Imagem ilustrativa da etapa de adição de resazurina aos poços com biofilmes pré-formados após exposição à nanoemulsão de macela nas concentrações de 80, 50, 25, 12 e 5% v/v. \* Ci = controle do inóculo.



## ANEXOS



**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 A7300B9**

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: **A7300B9**  
Usuário: **Gabriela Tasso Bongioiolo Pinheiro Machado**  
CPF/CNPJ: **052.703.259-00**  
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

#### Espécie

**Achyrocline satureioides Lam**

**Staphylococcus Staphylococcus**

Título da Atividade: **DESENVOLVIMENTO DE FORMAS FARMACÊUTICAS SUSTENTÁVEIS COM NANOEMULSÃO DE MACELA (Achyrocline satureioides) VISANDO À TERAPÊUTICA DA MASTITE BOVINA**

#### Equipe

<b>Gabriela Tasso Bongioiolo Pinheiro Machado</b>	<b>UFSC</b>
<b>Roberto Gabriel Ferreira</b>	<b>UFSC</b>
<b>Shirley Kuhnen</b>	<b>UFSC</b>
<b>Maria Beatriz da Rocha Veleirinho</b>	<b>UFSC</b>
<b>Leticia Mazzarino</b>	<b>UFSC</b>
<b>Luciana Aparecida Honorato</b>	<b>UFSC</b>
<b>Isadora Nicole Lara Piccinin</b>	<b>UFSC</b>
<b>Luiz Carlos Pinheiro Machado Filho</b>	<b>UFSC</b>

#### Parceiras Nacionais

**83.899.526/0001-82 / UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

#### Resultados Obtidos

**Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Impresso e digital.**

Data do Cadastro: **11/08/2020 15:16:45**

Situação do Cadastro: **Concluído**



**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 A2FCB22**

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: **A2FCB22**  
Usuário: **Gabriela Tasso Bongioiolo Pinheiro Machado**  
CPF/CNPJ: **052.703.259-00**  
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**  
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

**Espécie**

**Achyrocline satureioides Lam**  
**Achyrocline satureioides**

**Fonte do CTA**

**CTA de origem não identificável**

Título da Atividade: **Desenvolvimento de alternativas para o tratamento da mastite bovina através do uso de produtos naturais associados à nanotecnologia**

**Equipe**

<b>Gabriela Tasso Bongioiolo Pinheiro Machado</b>	<b>UFSC</b>
<b>Roberto Gabriel Ferreira</b>	<b>UFSC</b>
<b>Shirley Kuhnen</b>	<b>UFSC</b>
<b>Maria Beatriz da Rocha Veleirinho</b>	<b>UFSC</b>
<b>Letícia Mazzarino</b>	<b>UFSC</b>
<b>Luciana Aparecida Honorato</b>	<b>UFSC</b>
<b>Isadora Nicole Lara Piccinin</b>	<b>UFSC</b>
<b>Luiz Carlos Pinheiro Machado Filho</b>	<b>UFSC</b>

**Parceiras Nacionais**

**83.899.526/0001-82 / UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

Data do Cadastro: **22/10/2018 12:30:35**  
Situação do Cadastro: **Concluído**

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A.C. et al. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 565-573, 2016.
- ALENCAR, L.C.B. et al. Efeito modulador do extrato de plantas medicinais do gênero *Spondias* sobre a resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* à Eritromicina. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 1, 2015.
- ALGHARIB, S.A. et al. Nanoparticles for treatment of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Drug Delivery**, v. 27, n. 1, p. 292-308, 2020.
- ALMEIDA, D.F.L. **Estudo das vias metabólicas das plantas na síntese de pigmentos naturais**. 2017. Tese de Doutorado.
- ANTON, N. et al. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review. **Journal of controlled release**, v. 128, n. 3, p. 185-199, 2008.
- AIEMSAARD, J. et al. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. **Research in veterinary science**, v. 91, n. 3, p. e31-e37, 2011.
- AOUADA, F.A.; MATTOSO, L.H.C. Hidrogéis biodegradáveis: uma opção na aplicação como veículos carreadores de sistemas de liberação controlada de pesticidas. **Embrapa Instrumentação-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2009.
- ARIAS, J.L. et al. Squalene based nanocomposites: a new platform for the design of multifunctional pharmaceutical theragnostics. **ACS nano**, v. 5, n. 2, p. 1513-1521, 2011.
- ARREDONDO, M.F. et al. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) DC and some of its main flavonoids against oxidative stress. **Journal of ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 13-20, 2004.
- AVANCINI, C.A.M. et al. Disinfectant activity of the crude hydroalcoholic extract of *Achyrocline satureioides* (Asteraceae) on *Candida* spp. isolated in problem-situations of bovine mastitis. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 10, n. 4, p. 327-333, 2016.
- AVANCINI, C. et al. Antimicrobial activity of plants used in the prevention and control of bovine mastitis in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 894-9, 2008.
- BAJERSKI, L. et al. The use of Brazilian vegetable oils in nanoemulsions: an update on preparation and biological applications. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 3, p. 347-363, 2016.

- BAPTISTA, P.V. et al. Nano-strategies to fight multidrug resistant bacteria—"A Battle of the Titans". **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1441, 2018.
- BASANISI, M.G. et al. Molecular characterization of Staphylococcus aureus isolated from sheep and goat cheeses in southern Italy. **Small Ruminant Research**, v. 135, p. 17-19, 2016.
- BASKARAN, S.A. et al. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 4, p. 1423-1429, 2009.
- BENNETT, R.N.; WALLSGROVE, R.M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New phytologist**, v. 127, n. 4, p. 617-633, 1994.
- BIANCHI, S.E. Isolamento de achyrobichalcona e 3-O-metilquercetina a partir de inflorescências de Achyrocline satureioides utilizando cromatografia em contracorrente de alta performance (HPLC) e avaliação do potencial citotóxico in vitro em linhagem de câncer de mama MDA-MB-231. 2018. [Tese de Doutorado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018.
- BIDONE, J. et al. Incorporation of Achyrocline satureioides (Lam.) DC extracts into topical nanoemulsions obtained by means of spontaneous emulsification procedure. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 421-429, 2014.
- BLOWEY, R.; EDMONDSON, P. Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche: guía ilustrada y práctica. **Acribia**, 1999.
- BOELTER, R. Plantas medicinais usadas na medicina veterinária. **Clínica. Campo. Manipulacao. Pesquisa. UFSM. Brasil**, 2008.
- BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International journal of pharmaceuticals**, v. 280, n. 1-2, p. 241-251, 2004.
- BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001.
- BRANDÃO, H.M. et al. Nanotecnologia: a próxima revolução na agropecuária. **Rev. CFMV**, ano XVII, v.53, p.61-67, 2011.
- BRASIL 2014. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 17, de 18 de junho de 2014. Estabelece o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Brasil.
- BRASIL. 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 524, de junho de 2011. Normativa nº46 de 2011. Estabelece o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Brasil.

CAMARENA, J.; SÁNCHEZ, R. Infecção por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. **Rev. SEIMC–Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. España**, 1998.

CAMPO, V.L. et al. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis—A review. **Carbohydrate polymers**, v. 77, n. 2, p. 167-180, 2009.

CARNEIRO, D.M.V.F. et al. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1934-1943, 2009.

CASANOVA, L.; COSTA, S.S. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 575-595, 2017.

CASCONE, M.G.; MALTINTI, S. Hydrogels based on chitosan and dextran as potential drug delivery systems. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 10, n. 5, p. 301-307, 1999.

CASTRO, K.C. et al. Síntese de nanopartículas de quitosana/PLA para liberação controlada de antibiótico no tratamento de mastite. 2017.

CDC- Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>. Acesso em 20 de junho de 2020,

CHAKRAVARTHI, P.V.; BALAJI, S.N. Applications of nanotechnology in veterinary medicine. **Veterinary World**, v. 3, n. 10, 2010.

CHEN, H. et al. Rheological properties of flaxseed gum [J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**, v. 1, 2004.

CHEN, H. et al. Gelation properties of flaxseed gum. **Journal of food engineering**, v. 77, n. 2, p. 295-303, 2006.

CHUSRI, S. et al. Antibacterial and anti-biofilm effects of a polyherbal formula and its constituents against coagulase-negative and-positive staphylococci isolated from bovine mastitis. **Journal of applied animal research**, v. 45, n. 1, p. 364-372, 2017.

COSENTINO, M. et al. Immunomodulatory properties of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC infusion: a study on human leukocytes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 116, n. 3, p. 501-507, 2008.

CPRA - Centro Paranaense de Referência em Agroecologia. 2019. Sanidade em manejos agroecológicos na bovinocultura de leite. Disponível em: [http://www.cpra.pr.gov.br/arquivos/File/Cartilhas\\_e\\_Folders/cartilhasanidade.pdf](http://www.cpra.pr.gov.br/arquivos/File/Cartilhas_e_Folders/cartilhasanidade.pdf) Acesso em 10 de março de 2020.

CUNNINGHAM, J.G.; KLEIN, B.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**, 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 770 p.

DA SILVA MALUF, R.; RIBEIRO, A.B. resíduos de antibióticos em leite. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 1, 2012.

DAS, M.P. et al. In vitro antibacterial activity of two medicinal plants against bovine udder isolated bacterial pathogens from dairy herds. **Ethnobotanical leaflets**, v. 2009, n. 1, p. 18, 2009.

DASH, J.R. et al. Effects of herbal extract of *Ocimum sanctum* as supportive therapy with intravenous ceftriaxone in experimentally induced staphylococcal chronic mastitis in goat. **Small Ruminant Research**, v. 137, p. 1-8, 2016.

DELATTRE, C. et al. Galactans: an overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 54, n. 6, p. 1075-1092, 2011.

DIAZ, M.A.N. et al. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 724-728, 2010.

DILSHAD, S.M. et al. Documentation of ethnoveterinary practices for mastitis in dairy animals in Pakistan. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 30, n. 3, p. 167-171, 2010.

DISTANTINA, S. et al. Preparation and characterization of glutaraldehyde-crosslinked kappa carrageenan hydrogel. **Engineering Journal**, v. 17, n. 3, p. 57-66, 2013.

DO CARMO, G.M. et al. Effect of the treatment with *Achyrocline satureioides* (free and nanocapsules essential oil) and diminazene aceturate on hematological and biochemical parameters in rats infected by *Trypanosoma evansi*. **Experimental parasitology**, v. 149, p. 39-46, 2015.

DONG, X. et al. Doxorubicin and paclitaxel-loaded lipid-based nanoparticles overcome multidrug resistance by inhibiting P-glycoprotein and depleting ATP. **Cancer research**, v. 69, n. 9, p. 3918-3926, 2009.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

EID, S.Y. et al. Digitonin synergistically enhances the cytotoxicity of plant secondary metabolites in cancer cells. **Phytomedicine**, v. 19, n. 14, p. 1307-1314, 2012.

EL-SAYED, A.; KAMEL, M. Advanced applications of nanotechnology in veterinary medicine. **Environmental Science and Pollution Research**, v.17, n.16, p. 19073-19086, 2020.

ELSUPIKHE, R.F. et al. Green sonochemical synthesis of silver nanoparticles at varying concentrations of  $\kappa$ -carrageenan. **Nanoscale research letters**, v. 10, n. 1, p. 302, 2015.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (Juiz de Fora). **Controle da mastite**. 2011.

- ERSKINE, R. et al. Mastitis therapy and pharmacology. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 19, n. 1, p. 109-38, vi, 2003.
- ESAU, Katherine. **Anatomía de las plantas con semilla**. No. 581.4 E83Y, 2ª ed, Buenos Aires, 572p., 1977.
- ESTEVES, A.C.C. et al. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 798-806, Oct. 2004.
- FEDENIUK, R.W. et al. Composition and physicochemical properties of linseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 240-247, 1994.
- FEITOSA, F.L.F. **Semiologia Veterinária: A Arte do Diagnóstico**. 1ed., São Paulo: Editora Roca, p.424, 2004.
- FENG, Y. et al. Genetic characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Northwest China. **Journal of integrative agriculture**, v. 15, n. 12, p. 2842-2847, 2016.
- FERRER, M.C.C. et al. Designing nanogel carriers for antibacterial applications. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 5, p. 2105-2111, 2014.
- FIORDALISI, S.A.L. et al. The effects of Brazilian propolis on etiological agents of mastitis and the viability of bovine mammary gland explants. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 3, p. 2308-2318, 2016.
- FIORDALISI, S.A.L. Potencial de produtos naturais no controle da mastite bovina: teor de fenólicos e flavonoides, atividade antimicrobiana e efeitos sobre as células epiteliais mamárias bovina, [Tese de Doutorado]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2018a.
- FIORDALISI, S.A.L. et al. Aloe barbadensis Miller leaf exudate is a potential treatment for bovine mastitis. **F1000Research**, v. 7, n. 1285, p. 1285, 2018b.
- FOLDENAUER, M.P. Ação antisséptica do selante à base de extrato alcoólico de *Corymbia citriodora* utilizado pós-ordenha, [Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Agricultura Familiar Camponesa]. Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria, 2016.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION-FDA.US Disponível em: <http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/Nanotechnology/default.htm>. Acesso em 13 de janeiro de 2017.
- FOWLER, M.W. Plants, medicines and man. **J. Sci. Food Agric.**, 86(12), pp. 1797-1804, 2006.
- FRANDSON, R.D. et al. **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 454p, 2005.

FRANZ, G. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts. **Planta Medica**, v. 55, n. 06, p. 493-497, 1989.

FRASER, C.M. et al. **Manual Merck de veterinária: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário**. 7ª edição. São Paulo, Roca, 1996.

FRATINI, F. et al. Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. **Fitoterapia**, v. 96, p. 1-7, 2014.

FREY-WYSSLING, A. Mucilages and Gums. In: **The plant cell wall, Encyclopedia of Plant Anatomy**, Gebriider Bomtraeger, Berlin-Stuttgart; pp, 120-124, 1976.

GHASEMZADEH, A.; GHASEMZADEH, N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. **Journal of medicinal plants research**, v. 5, n. 31, p. 6697-6703, 2011.

GEEVER, L.M. et al. Characterisation and controlled drug release from novel drug-loaded hydrogels. **European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 3, p. 1147-1159, 2008.

GEHRING, R.; SMITH, G. W. An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 29, n. 4, p. 237-241, 2006.

GONSALES, G.Z. et al. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. 276-284, 2006.

GOPINATH, S.M. et al. Evaluation of antibacterial activity of *Tabernaemontana divaricata* (L.) leaves against the causative organisms of bovine mastitis. **Int J Res Phytochem Pharmacol**, v. 1, n. 4, p. 211-213, 2011.

GOYAL, A. et al. Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. **Journal of food science and technology**, v. 51, n. 9, p. 1633-1653, 2014.

GRUET, P. et al. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. **Advanced drug delivery reviews**, v. 50, n. 3, p. 245-259, 2001.

GUIMARÃES, J.L.B. et al. Estimate of the economic impact of mastitis: A case study in a Holstein dairy herd under tropical conditions. **Preventive veterinary medicine**, v. 142, p. 46-50, 2017.

GUTTERMAN, Y.; SHEM-TOV, S. Structure and function of the mucilaginous seed coats of *Plantago coronopus* inhabiting the Negev Desert of Israel. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 44, n. 2-3, p. 125-133, 1996.

- HASE, P. et al. Management of subclinical mastitis with mastilep gel and herbal spray (AV/AMS/15). **International Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, p. 64-67, 2013.
- HAUBERT, L. et al. First report of the Staphylococcus aureus isolate from subclinical bovine mastitis in the South of Brazil harboring resistance gene dfrG and transposon family Tn916-1545. **Microbial pathogenesis**, v. 113, p. 242-247, 2017.
- HARBORNE, J.B. Classes and functions of secondary products from plants. **Chemicals from plants**. Imperial College Press, London, p. 1-25, 1999.
- HARBORNE, J. B. Role of secondary metabolites in chemical defence mechanisms in plants. In: **Ciba Foundation Symposium 154-Bioactive Compounds from Plants: Bioactive Compounds from Plants: Ciba Foundation Symposium 154**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., p. 126-139, 2007.
- HASNAIN, M.S. et al. Isolation and characterization of Linum usitatissimum polysaccharide to prepare mucoadhesive beads of diclofenac sodium. **International journal of biological macromolecules**, v. 116, p. 162-172, 2018.
- HASEEB, M.T. et al. Polysaccharides based superabsorbent hydrogel from Linseed: Dynamic swelling, stimuli responsive on-off switching and drug release. **Carbohydrate polymers**, v. 136, p. 750-756, 2016.
- HASEEB, M.T. et al. Linseed polysaccharides based nanoparticles for controlled delivery of docetaxel: design, in vitro drug release and cellular uptake. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 49, p. 143-151, 2019.
- HÉBERT, A. et al. Demonstration of intracellular Staphylococcus aureus in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. **FEMS microbiology letters**, v. 193, n. 1, p. 57-62, 2000.
- HIDALGO, D.E. et al. Avaliação da adoção de práticas de manejo do rebanho leiteiro no processo de Transição para a criação animal agroecológica. **Cadernos de Agroecologia**, v. 2, n. 2, 2007.
- HOLZSCHUH, M.H. et al. Identification and stability of a new bichalcone in Achyrocline satureioides spray dried powder. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, n. 9, p. 650-656, 2010.
- HOSOKAWA, M. et al. **Nanoparticle technology handbook**, Elsevier, 2<sup>a</sup> ed, 2007.
- IRACHE, J.M. et al. Nanomedicine: novel approaches in human and veterinary therapeutics. **Veterinary parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 47-71, 2011.
- JOO, H.S.; OTTO, M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 12, p. 1503-1513, 2012.

JORAY, M.B. et al. Understanding the interactions between metabolites isolated from *Achyrocline satureioides* in relation to its antibacterial activity. **Phytomedicine**, v. 20, n. 3-4, p. 258-261, 2013.

JOSHI, Y. et al. Evaluation of synergistic antimicrobial activity of Gemifloxacin with *Linum usitatissimum* seed oil. **liver**, v. 2, p. 4, 2014.

KAITHWAS, G. et al. *Linum usitatissimum* (linseed/flaxseed) fixed oil: antimicrobial activity and efficacy in bovine mastitis. **Inflammopharmacology**, v. 19, n. 1, p. 45-52, 2011.

KALAYOU, S. et al. In-vitro antimicrobial activity screening of some ethnoveterinary medicinal plants traditionally used against mastitis, wound and gastrointestinal tract complication in Tigray Region, Ethiopia. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 7, p. 516-522, 2012.

KANMANI, P.; RHIM, J.W. Development and characterization of carrageenan/grapefruit seed extract composite films for active packaging. **International journal of biological macromolecules**, v. 68, p. 258-266, 2014.

KHALIL, H.P.S.A. et al. Seaweed based sustainable films and composites for food and pharmaceutical applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 77, p. 353-362, 2017.

KHAN, Z.J. et al. Therapeutics, phytochemistry and pharmacology of Tukhm-e-Katan (*Linum usitatissimum* L.). **Int J Adv Pharm Med Bioallied Sci**, v. 2017, p. 111, 2017.

KRISHNA, A.N. et al. Formulation, Evaluation of Nano Copper Gel For Treatment of Clinical Mastitis. **J Pharm Res**, v. 11, p. 554-7, 2017.

KUMAR, AD N. et al. Protective effect of 3-O-methyl quercetin and kaempferol from *Semecarpus anacardium* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced cytotoxicity in lung and liver cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2016.

KUZMA, J. Nanotechnology in animal production—Upstream assessment of applications. **Livestock Science**, v. 130, n. 1-3, p. 14-24, 2010.

LANCTÔT, S. et al. Effect of intramammary infusion of chitosan hydrogels at drying-off on bovine mammary gland involution. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 3, p. 2269-2281, 2017.

LANGONI, H. et al. Considerations on the treatment of mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1261-1269, 2017.

LESNICHAYA, M.V. et al. Silver-containing nanocomposites based on galactomannan and carrageenan: synthesis, structure, and antimicrobial properties. **Russian Chemical Bulletin**, v. 59, n. 12, p. 2323, 2010.

LIANG, S. et al. Preparation of ceftiofur nanoemulsion and its antimicrobial effect on major pathogenic bacteria of bovine mastitis. **Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)**, n. 2, p. 26, 2018.

LIN, C.C. et al. Metal chelating affinity hydrogels for sustained protein release. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 83, n. 4, p. 954-964, 2007.

LOCATELLI, C. et al. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy cattle herds, related swine farms, and humans in contact with herds. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 1, p. 608-619, 2017.

LORENZI, H.; **Plantas Daninhas do Brasil**, 3<sup>a</sup> ed., Ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Ltda., Nova Odessa, p.116, 2000.

LOZANO, C. et al. Empyema caused by MRSA ST398 with atypical resistance profile, Spain. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 138, 2011.

MALZAHN, K. et al. Advanced dextran based nanogels for fighting *Staphylococcus aureus* infections by sustained zinc release. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 15, p. 2175-2183, 2014.

MATIAS, E.F.F. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistência bacteriana a aminoglicosídeos de extratos polares e apolares de *Croton campestris* A.(velame), *Ocimum gartissimum* (alfavaca) e *Cordia verbanacea* DC.(ervabaleeira). **Crato, CE: Universidade Regional do Cariri-URCA**, 2010.

MEDEIROS, E.S. et al. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 569-574, 2009.

MEENA, N. et al. Applications of nanotechnology in veterinary. **Vet World**, v. 3, n. 10, p. 477-480, 2018.

MEHNERT, W. et al. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 83-101, 2012.

MIN, B.R. et al. Comparative antimicrobial activity of tannin extracts from perennial plants on mastitis pathogens. **Scientific Research and Essay**, v. 3, n. 2, p. 066-073, 2008.

MISTRY, P.H. et al. Effect of high-pressure homogenization and stabilizers on the physicochemical properties of curcumin-loaded glycerol monooleate/chitosan nanostructures. **Nanomedicine**, v. 7, n. 12, p. 1863-1876, 2012.

MOHANRAJ, V.J.; CHEN, Y. Nanoparticles-a review. **Tropical journal of pharmaceutical research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MOHAMMED, W.H. et al. Evaluation of in vitro drug release kinetics and antibacterial activity of vancomycin HCl-loaded nanogel for topical application. **Journal of**

**Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, n. 11, p. 2747-2756, 2018.

MOHSEABADI, N. et al. Physical and antimicrobial properties of starch-carboxy methyl cellulose film containing rosemary essential oils encapsulated in chitosan nanogel. **International journal of biological macromolecules**, v. 112, p. 148-155, 2018.

MONTEIRO, M.M.C. **Síntese de hidrogéis biocompatíveis para encapsulamento de fármacos**. 2014. Dissertação de Mestrado.

MONTIRONI, I.D. et al. Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. **Revista Argentina de microbiologia**, v. 48, n. 3, p. 210-216, 2016.

MORDMUANG, A. et al. (Aiton) Hassk. leaf extract: An alternative approach for the treatment of staphylococcal bovine mastitis. **Research in veterinary science**, v. 102, p. 242-246, 2015.

MOTA, F.M. et al. Atividade antibacteriana in vitro de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.-Asteraceae ("macela", "marcela") sobre agentes bacterianos de interesse em alimentos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 298-304, 2011.

MUBARACK, H.M. et al. Activity of some selected medicinal plant extracts against bovine mastitis pathogens. **J. Anim. Vet. Adv**, v. 10, n. 6, p. 738-741, 2011.

MUHAMAD, I.I. et al. Natural polysaccharide-based composites for drug delivery and biomedical applications. In: **Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications**. Academic Press, 2019. p. 419-440.

MUSHTAQ, S. et al. Isolation, characterization and HPLC quantification of compounds from *Aquilegia fragrans* Benth: Their in vitro antibacterial activities against bovine mastitis pathogens. **Journal of ethnopharmacology**, v. 178, p. 9-12, 2016.

MUSHTAQ, S. et al. Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. **Microbial pathogenesis**, v. 114, p. 357-361, 2018.

NADER, Talita Thomaz. **[Tese de Doutorado]** Atividade antibacteriana in vitro de extratos e substâncias isoladas de espécies de *Croton* frente *Staphylococcus aureus* causador de mastite bovina. Jaboticabal, 2014.

NARAN, R. et al. Novel rhamnogalacturonan I and arabinoxylan polysaccharides of flax seed mucilage. **Plant physiology**, v. 148, n. 1, p. 132-141, 2008.

NATH, A.; JOSHI, S.R. Ultrastructural effect on mastitis pathogens by extract of endophytic fungi associated with ethnoveterinary plant, *Hibiscus sabdariffa* L. **Journal of microscopy and ultrastructure**, v. 3, n. 1, p. 38-43, 2015.

NETO, J.A.R. et al. Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 112547,

2020.

NERO, L.A. et al. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 2, p. 391-393, 2007.

NICKERSON, S.C. Estrategias de Prevención y Control de Mastitis. Asociación pro calidad de la leche y sus derivados (APROCAL), 1995. Disponível: em [http://www.aprocal.com.ar/wpcontent/uploads/estrategias\\_prevencion\\_y\\_control\\_mastitis.htm.pdf](http://www.aprocal.com.ar/wpcontent/uploads/estrategias_prevencion_y_control_mastitis.htm.pdf). Acesso em 17 de janeiro de 2020.

OLIVEIRA, A.C.; SILVA, R.S. Challenges in healthcare attention with regard to bacterial resistance: a review. **Rev Eletr Enf**, v. 10, n. 1, p. 189-197, 2008.

OLIVEIRA, L. et al. Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 4, p. 1913-1920, 2012.

ORELLANO, M.S. et al. Chitosan nanoparticles enhance the antibacterial activity of the native polymer against bovine mastitis pathogens. **Carbohydrate polymers**, v. 213, p. 1-9, 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE-OMS., 2017. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812); Acesso em 21 de abril de 2020.

OSONWA, U.E. et al. Formulation and Evaluation of Therapeutic Potential of Nanoemulsion of a Blend of Antimicrobial Oils. **Trop J Nat Prod Res**, v. 2, n. 2, p. 67-73, 2018.

OVIEDO, I.R. et al. Design of a physical and nontoxic crosslinked poly (vinyl alcohol) hydrogel. **International Journal of Polymeric Materials**, v. 57, n. 12, p. 1095-1103, 2008.

PINHEIRO MACHADO, G.T. et al. 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, n. 4, p. 713-723, 2019.

PINTO, M.S. et al. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001.

PIRES, V.G.A; MOURA, M.R. Preparação de novos filmes poliméricos contendo nanoemulsões do óleo de melaleuca, copaíba e limão para aplicação como biomaterial. **Quím. Nova**, v. 40, n. 1, p. 1-5, 2017.

POND, W. et al. Animal welfare in animal agriculture: husbandry, stewardship, and sustainability in animal production. **CRC press**, 2011.

QUINN, P.J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed Editora,

2005.

RABELLO, R.F. et al. Antimicrobial Resistance in Farm Animals in Brazil: An Update Overview. **Animals**, v. 10, n. 4, p. 552, 2020.

RADOSTITS, O.M. et al. **Veterinary clinical examination and diagnosis**. WB Saunders, 2006.

RECH, RITA JANDIRA. **[Dissertação de Mestrado]**. Agricultura Camponesa Agroecológica e a Relação com a Ocorrência da Mastite Bovina: Um estudo de caso nos municípios de Laranjeiras do Sul e Rio Bonito do Iguaçu. São Paulo, 2018.

RESHI, A.I. et al. Efficacy of *Fumaria indica*, *Nepata cataria* and *Adiantum capillus* crude aqueous extracts in comparison to cefuroxime in sub-clinical cases of bovine mastitis. **International Journal of Livestock Research**, v. 7, n. 3, p. 100-107, 2017.

RETTA, D. et al. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 27-38, 2012.

RIVERA, F. et al. Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Marcela). **Journal of ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 359-362, 2004.

RIVIERE, J.E. The future of veterinary therapeutics: A glimpse towards 2030. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 462-471, 2007.

RODRIGUES, F.G. et al. Atividade bactericida da copaifera sp. frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer, Goiânia**, v. 9, n. 17, p. 293-301, 2013.

RUIZ, A.K. et al. Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: comparación entre ordeño manual y mecánico, en Pernambuco, Brasil. **Revista de Salud Animal**, v. 33, n. 1, p. 57-64, 2011.

SABINI, M.C. et al. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Food and chemical toxicology**, v. 60, p. 463-470, 2013.

SABOUR, P.M. et al. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3449-3455, 2004.

SALGUEIRO, A.C.F. et al. In vitro and in silico antioxidant and toxicological activities of *Achyrocline satureioides*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 194, p. 6-14, 2016.

SANGWAN, Y.K. et al. Mucilages and their pharmaceutical applications: An overview. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 1265-1271, 2011.

SANTANA, H.F. et al. Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **World Journal of Microbiology**

**and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 485-491, 2012.

SCHIAVON, D.B.A. **Aplicação de um fitoterápico a base de Tagetes minuta na anti-sepsia de tetos de vacas pós-ordenha**. 2011. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

SCHUCH, L.F.D. [**Tese de Doutorado**]. Plantas medicinais em atenção primária veterinária: atividade antimicrobiana frente a bactérias relacionadas com mastite bovina e a dermatófitos. Porto Alegre, 2008.

SCHWARZ, S. et al. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 601-604, 2010.

SILVA, J.C. et al. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1790-1795, 2012.

SIMÕES, C.M.O. et al. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., compositae. **Journal of ethnopharmacology**, v. 22, n. 3, p. 281-293, 1988.

SHAFI, T.A. et al. Evaluation of immunotherapeutic potential of *Ocimum sanctum* bovine subclinical mastitis. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 40, n. 3, p. 352-358, 2016.

SHARMA, A. et al. Effect of polyherbal preparation supplementation on immunity and udder health of periparturient Karan-Fries crossbred dairy cows. **Journal of Applied Animal Research**, v. 42, n. 2, p. 217-221, 2014.

SHOJAEE-ALIABADI, S. et al. Characterization of  $\kappa$ -carrageenan films incorporated plant essential oils with improved antimicrobial activity. **Carbohydrate polymers**, v. 101, p. 582-591, 2014a.

SHOJAEE-ALIABADI, S. et al. Characterization of nanobiocomposite kappa-carrageenan film with *Zataria multiflora* essential oil and nanoclay. **International journal of biological macromolecules**, v. 69, p. 282-289, 2014b.

SOAVI, L. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398, **Emerging Infectious Diseases** • www.cdc.gov/eid • Vol. 16, No. 2, February, Italy. 2010.

SPOHR, M. et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in three dairy herds in southwest Germany. **Zoonoses and Public Health**, v. 58, n. 4, p. 252-261, 2011.

SUNDER, J. et al. Effect of feeding of *Morinda citrifolia* fruit juice on the biophysical parameters of healthy as well as mastitis-affected cow milk. **Journal of applied animal research**, v. 41, n. 1, p. 29-33, 2013.

SUTRADHAR, K.B.; AMIN, Md Lutful. Nanoemulsions: increasing possibilities in drug delivery. **European Journal of Nanomedicine**, v. 5, n. 2, p. 97-110, 2013.

TADELE, T. et al. A study on in-vitro antimicrobial effects of some selected plants on *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. **Internet Journal of Veterinary Medicine**, v. 8, n. 1, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.. Metabólitos secundários e defesa vegetal. **Fisiologia vegetal**, v. 4, Editora Arned, Porto Alegre, 2004.

THIMOTHY H.O. **Medicina Interna de Grandes Animais.**, Editora Artmed, p. 295-296, Porto Alegre, RS, 2000.

TRONCARELLI, M. Z. et al. Nanotechnology and antimicrobials in veterinary medicine. **Badajoz, Spain: FORMATEX**, 2013.

UNDERWOOD, C.; VAN EPS, A. W. Nanomedicine and veterinary science: The reality and the practicality. **The Veterinary Journal**, v. 193, n. 1, p. 12-23, 2012.

USMAN, A. et al. Algal polysaccharides, novel application, and outlook. In: **Algae based polymers, blends, and composites**. Elsevier, 2017. p. 115-153.

VANDAMME, T.F.; ANTON, N. Low-energy nanoemulsification to design veterinary controlled drug delivery devices. **International journal of nanomedicine**, v. 5, p. 867, 2010.

VARGAS, R.M.F. et al. Natural products obtained by subcritical and supercritical fluid extraction from *Achyrocline satureioides* (Lam) DC using CO<sub>2</sub>. **Industrial crops and products**, v. 50, p. 430-435, 2013.

VEIGA JUNIOR, V.F. et al. Plantas medicinais: cura segura?. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIEIRA, T. et al. Detection of antibiotic residues in pasteurized milk samples from Parana State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 791-796, 2012.

VINTOV, J. A. N. et al. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. **Veterinary microbiology**, v. 95, n. 1-2, p. 133-147, 2003.

WANG, T. et al. Preparation, characterisation and antibacterial activity of a florfenicol-loaded solid lipid nanoparticle suspension. **IET nanobiotechnology**, v. 9, n. 6, p. 355-361, 2015.

WANG, K. et al. Effects of Chinese propolis in protecting bovine mammary epithelial cells against mastitis pathogens-induced cell damage. **Mediators of inflammation**, v. 2016, 2016.

WARRANT, J. et al. Structural investigations of the neutral polysaccharide of *Linum usitatissimum* L. seeds mucilage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 35, n. 3-4, p. 121-125, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) et al. **Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review**. Geneva: World Health Organization, 1998.

YANG, X.F. et al. Combination antibacterial effect of compound amoxicillin and levofloxacin hydrochloride nanoemulsion against three main pathogenic bacteria of cow mastitis in vitro. **Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)**, v. 35, n. 5, p. 585-590, 2009.

ZHANG, Q. et al. Nanoemulsion formulation of florfenicol improves bioavailability in pigs. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 39, n. 1, p. 84-89, 2016.

ZHAO, X.; LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. **Journal of animal science**, v. 86, n. suppl\_13, p. 57-65, 2008.

ZORZI, G.K. et al. Antioxidant effect of nanoemulsions containing extract of *Achyrocline satureioides* (Lam) DC—Asteraceae. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n. 4, p. 844-850, 2016.