

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS DE POLI (ϵ -CAPROLACTONA) CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *CYMOPOGON WINTERIANUS* E SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE BIOFILME EM CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADOS DE CASOS DE MASTITE BOVINA

Layane Lina Maia Taveira¹, Vitoria B. Fieldkircher Caus², Cristian Ferreira Corona³, Gabriela Suthovski⁴, Dalila Moter Benvegnú⁵

1. Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)
2. Graduada em Licenciatura em Ciências Biológicas, UFFS
3. Graduando do curso de Nutrição, UFFS
4. Mestre em Saúde, Bem-estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul, UFFS
5. Doutorado em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Orientador

Resumo

A mastite bovina é uma enfermidade que possui alta prevalência nos rebanhos leiteiros e caracteriza-se pela inflamação das glândulas mamárias de bovinos. O principal microrganismo causador dessa doença é a bactéria *Staphylococcus aureus*, comumente resistente aos antibióticos convencionais. O uso indiscriminado de antibióticos prejudica o bem-estar do animal, a qualidade do leite e aumenta o custo da cadeia leiteira, gerando impacto econômico prejudicial. Alternativas aos tratamentos convencionais que proporcionem menores custos e efeitos adversos seriam ideais. Nesse sentido, os óleos essenciais (OE) são conhecidos como agentes antimicrobianos naturais, além de propriedades anti-inflamatória e antioxidante. Portanto, o objetivo desse estudo é produzir nanocápsulas de poli (ϵ -caprolactona) contendo OE de *Cymbopogon winterianus* para atuar em agentes infecciosos causadores de mastite.

Palavras-chave: Gado leiteiro; Fitoterapia; Tratamento alternativo

Apoio financeiro: PIBITI/UFFS

Trabalho selecionado para a JNIC: UFFS

Introdução

A mastite em bovinos leiteiros é uma infecção que resulta em inflamação da glândula mamária (Varela-Ortiz et al., 2018). O principal agente etiológico desta doença é a bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus*, que, dentre seus mecanismos de resistência microbiana apresenta a capacidade de formar biofilmes, substâncias que protegem as colônias bacterianas de agentes externos conferindo perda de sensibilidade a praticamente todas as classes de antibióticos (Notcovich et al. 2018). Os biofilmes são fontes importantes de contaminação por aderirem à superfície de materiais comumente encontrados na ordenha de bovinos como vidro e polipropileno (Varela-Ortiz et al. 2018).

A fim de possibilitar a diminuição da contaminação por *S. aureus* buscam-se alternativas naturais capazes de eliminar ou reduzir biofilmes, como, óleos essenciais (OEs), que, têm apresentado efeitos antimicrobianos promissores (Varela-Ortiz et al., 2018). O óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) (OEC) possui moléculas chamadas cuminal e β -citronelal, além de terpenóides responsáveis por sua atividade antifúngica, antimicrobiana e antibiofilme (Deletre et al. 2015).

Apesar de sua atividade antibacteriana, os OEs não são amplamente aplicados devido à sua volatilidade e solubilidade, problema que, pode ser resolvido com a sua nanoencapsulação (Miladi et al., 2016; Saporito et al., 2018; Kokina et al., 2019). Além de proteção dos OEs contra a degradação precoce, as nanocápsulas promovem sua liberação prolongada (Miladi et al., 2016; Kokina et al., 2019).

O objetivo deste estudo foi produzir nanocápsulas de poli (ϵ -caprolactona) contendo OE de *Cymbopogon winterianus* e avaliar sua eficácia na redução de biofilmes formados por *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina, *in vitro*.

Metodologia

Foram utilizadas 27 cepas de *S. aureus* doadas pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Universidade de São Paulo (LZB / FMV / USP-SP) com o registro no SISGEN (protocolo Nº AF210ED). O OE de citronela (*Cymbopogon winterianus* - OEC) foi adquirido da Laszlo Aromaterapia®.

Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram determinados pela técnica de microdiluição em caldo Mueller-Hinton (MHA) (CLSI 2015), foi adicionado polissorbato para melhor solubilização do OEC no caldo. Os valores de CIM foram interpretados como o poço em que a Densidade Óptica (DO) teve a maior diluição de OEC, e confirmada após 25 μ L de resazurina 0,01% para determinar o metabolismo microbiano. As soluções dos poços foram transferidas para placas de ágar MHA, incubadas a 37 °C por 24 h. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi considerada a concentração mínima de OE capaz de matar bactérias.

As nanocápsulas contendo OEC foram obtidas pela técnica de nanoprecipitação segundo Fessi et al. (1989), com modificações. O tamanho da partícula, o potencial zeta e o índice de polidispersidade (IPD) foram determinados usando espalhamento dinâmico de luz (DLS) (ZS-90, Malvern®).

As cepas de *S. aureus* foram avaliadas quanto à sua eficácia em formar biofilmes em superfícies de polipropileno e vidro. Para simular as superfícies, foram utilizadas esferas de 4,0 mm de diâmetro, higienizadas segundo Marques et al. (2007) e esterilizadas em autoclave. O método para investigar a formação do biofilme seguiu descrito por Stepanovic et al. (2007), com algumas modificações. Um tubo de bactérias foi retirado da incubação e o biofilme foi ressuspensão e lido nos intervalos: 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h. O gráfico com as absorbâncias obtidas demonstrou o ponto de máxima formação do biofilme; que foi usado para analisar a formação de biofilme das cepas nas superfícies.

Após a inoculação de cepas clínicas de *S. aureus* em Caldo Tripton Soja (TSB) a 37 ° C por 24 h, TSB foi adicionado a cada tubo de cepa até que a turbidez do inóculo atingisse 0,5 McFarland (CLSI, 2015). Cada inóculo padronizado foi pipetado em duplicata, em uma microplaca de 96 poços. Para uma pipetagem mais precisa do óleo, o óleo de citronela foi diluído em água com 1% de polissorbatato 80, foi utilizado controles contendo uma mistura de água e polissorbatato 80. Para o OEC nanoencapsulado, o volume de solução a ser adicionado foi calculado individualmente, considerando cada cepa.

Os valores de CIM, CBM e a interferência na formação do biofilme considerando tratamentos e superfícies foram analisados pelos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e D'Agostino. As diferenças entre polipropileno e vidro, OEC livre e nanoencapsulado foram analisadas diretamente aos pares, por meio do teste t. Todas as análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 7.01, considerando uma diferença estatística entre os grupos $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

As nanocápsulas apresentaram formato ovóide com o diâmetro médio de acordo com a análise DLS de cerca de 280 nm. O tamanho das nanocápsulas está de acordo com os requisitos para aplicações biológicas, e o IPD apresentou uma distribuição de tamanho monodispersa, uma vez que foram obtidos valores $< 0,25$ (Fessi et al., 1989; Miladi et al., 2016). O potencial zeta das nanocápsulas foi negativo, desempenhando um papel fundamental na estabilidade física da nanosuspensão devido à repulsão entre as partículas, evitando a agregação (Miladi et al., 2016; Kokina et al., 2019). A eficiência de Encapsulamento - EE% utilizando PCL como polímero, para o óleo, foi superior a 90%. A eficiência de encapsulamento foi elevada devido ao aprisionamento da fase oleosa, representada por OEs no núcleo circundado pela cobertura da PCL, evitando o vazamento de óleo para a fase aquosa (Miladi et al., 2016).

As cepas clínicas de *S. aureus* foram capazes de formar biofilmes na mesma intensidade nas duas superfícies testadas quando nenhum tratamento foi aplicado (grupos controle). Quando ambas as superfícies foram tratadas com OEC livre, a formação de biofilme aumentou em comparação com os grupos de controle. O OEC nanoencapsulado reduziu significativamente a formação de biofilme na superfície do vidro ($p = 0,030$) e mostrou uma tendência a diminuir a formação de biofilme na superfície de polipropileno ($p = 0,051$).

Considerando todas as cepas testadas, o OEC demonstrou CIM $\geq 0,08\%$ (v/v), valor inferior quando comparado aos achados de Oussalah et al. (2007), que testou citronela OE (*Cymbopogon winterianus*) contra cepas de *S. aureus* e obteve uma CIM média $\geq 0,8\%$ (v/v) e uma CBM $\leq 0,8\%$ (v/v). Diferenças na composição e técnicas do OE podem explicar essas variações, onde uma maior quantidade de terpenóides poderia causar uma diminuição nos valores de CIM e CBM, conforme indicado por Kim et al. (1995).

Apenas as nanocápsulas OEC livres foram eficazes contra a formação de biofilme. O OE livres apresentou efeito contrário, facilitando mais a formação de biofilme, também quando comparados aos grupos sem nenhum tratamento. Uma explicação para a diferença na eficácia entre o OEC livre e o nanoencapsulado pode ser o seu perfil de liberação diferente das nanocápsulas (de Souza et al. 2017). Provavelmente, isso ocorreu porque os óleos livres foram prontamente consumidos ou porque a concentração do óleo usado no experimento para a formação de biofilme em superfícies foi baseada em valores de CIM (uma medida bacteriostática) e não em valores de CBM (potencial bactericida). Assim, células remanescentes poderiam reiniciar a colônia, formando biofilmes para proteger a bactéria.

O citronelal, um importante aldeído linear encontrado no OEC, pode estabelecer mais ligações de hidrogênio, além de ser capaz de escapar da estrutura da nanocápsula com mais facilidade. Isto explica o fato do OEC poder atuar em superfícies hidrofílicas, como o vidro, com maior eficácia. No polipropileno, a hidrofobicidade apresentada na interface da superfície com o ambiente externo evita a aderência de substâncias hidrofílicas (Araújo et al. 2010).

Conclusões

O OEC demonstrou potencial bacteriostático e bactericida contra *S. aureus* na forma livre e viabilidade para ser usado no desenvolvimento de formulações de nanocápsula. Além disso, somente o OEC nanoencapsulado foi capaz de interagir com os biofilmes bacterianos, mas não o OEC livre. Ainda, a formulação nanoencapsulada foi capaz de reduzir significativamente a formação de biofilme na superfície de vidro e demonstrou uma tendência de redução do biofilme na superfície de polipropileno.

Referências bibliográficas

- Araújo EA, Andrade NJ De, Carvalho AF De, Mota A, Henrique L (2010) Aspectos coloidais da adesão de microorganismos. *Quim. Nova.* 33:1940–1948. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000900022>
- de Souza ME, Clerici DJ, Verdi CM, Fleck G, Quatrin PM, Spat LE, Bonez PC, Santos CF dos Antoniazzi RP, Zanatta FB, Gundel A, Martinez DST, de Almeida Vaucher R, Santos RCV (2017) Antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* nanoparticles in polymicrobial biofilm in situ. *Microb Pathog* 113:432–437. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.005>
- Deletre E, Chandre F, Williams L, Duménil C, Menut C, Martin T (2015) Electrophysiological and behavioral characterization of bioactive compounds of the *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon winterianus*, *Cuminum cyminum* and *Cinnamomum zeylanicum* essential oils against *Anopheles gambiae* and prospects for their use as bednet treatments. *Parasites and Vectors* 8:1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0934-y>
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S (1989) Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm* 55:1–4. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0)
- Kim JM, Marshall L, Cornell JA, III JFP, Wei CI (1995) Antibacterial Activity of Carvacrol, Citral, and Geraniol against *Salmonella typhimurium* in Culture Medium and on Fish Cubes. *J Food Sci* 60:1364–1368. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb04592.x>
- Kokina M, Salević A, Kalušević A, Lević S, Pantić M, Pljevljakušić D, Šavikin K, Shamtsyan M, Nikšić M, Nedović V (2019) Characterization, Antioxidant and Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Encapsulation into Biodegradable Material Followed by Freeze-Drying. *Food Technol Biotechnol* 57:282–290. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.02.19.5957>
- Marques SC, Rezende JDGOS, Alves LADF, Silva BC, Alves E, De Abreu LR, Piccoli RH (2007) Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian J Microbiol* 38:538–543. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000300029>
- Miladi K, Sfar S, Fessi H, Elaissari A (2016) Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications in Vauthier C and Ponchel G (eds.), *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines*. 1st ed. Springer International Publishing, Switzerland, pp 17-53.
- Notcovich S, DeNicolo G, Flint SH, Williamson NB, Gedye K, Grinberg A, Lopez-Villalobos N (2018) Biofilm-forming potential of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in New Zealand. *Vet Sci* 5. <https://doi.org/10.3390/vetsci5010008>
- Stepanović, S; Vuković, D; Dakić, I; Savić, B; Ivabić-Vlahović, M (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal Of Microbiological Methods* 40:175-179. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7012\(00\)00122-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00122-6)
- Varela-Ortiz DF, Barboza-Corona JE, González-Marrero J, León Galván MF, Valencia-Posadas M, Lechuga-Arana AA.