UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANA COM ÓLEO ESSENCIAL COMO ALTERNATIVA ANTIMICROBIANA CONTRA A MASTITE BOVINA

NIELY PRISCILA CORREIA DA SILVA

RECIFE
2022

NIELY PRISCILA CORREIA DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANA COM ÓLEO ESSENCIAL COMO ALTERNATIVA ANTIMICROBIANA CONTRA A MASTITE BOVINA

Defesa de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena.

RECIFE
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586 Silva, Niely Priscila Correia da
DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANA COM ÓLEO ESSENCIAL COMO ALTERNATIVA ANTIMICROBIANA CONTRA A MASTITE BOVINA / Niely Priscila Correia da Silva. - 2022.
87 f.

Orientador: Pabyton Goncalves Cadena.
Inclui referências e anexo(s).

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2022.

1. Óleos essenciais. 2. Staphylococcus aureus. 3. Quitosana. 4. Nanotecnologia. 5. Antibacteriano. I. Cadena, Pabyton Goncalves, orient. II. Título

CDD 636.089

NIELY PRISCILA CORREIA DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANA COM ÓLEO ESSENCIAL COMO ALTERNATIVA ANTIMICROBIANA CONTRA A MASTITE BOVINA

Data da defesa: 22/02/2022

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA:

_____

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena (Presidente)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

_____

Profª. Drª. Elizabeth Sampaio de Medeiros (Titular)
Departamento de Medicina Veterinária
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

_____

Profª. Drª. Marilia Ribeiro Sales Cadena (Titular externo)
Departamento de Biologia
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Dedico

Este trabalho primeiramente a Deus, a toda minha família por todo amor, apoio e incentivo dados a mim; Amo vocês. E a todos que contribuíram para a realização deste projeto de forma direta ou indireta. Muito Obrigada.

AGRADECIMENTOS

A Deus por seu imenso amor que me fortalece e me sustenta todos os dias, por me capacitar e ajudar durante todas as etapas deste trabalho, pela saúde e forças em todos os momentos e por não me deixar desistir desta jornada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena, pela paciência, orientação e suportes necessários que foram fundamentais para execução deste trabalho. Obrigada por tudo.

Aos colaboradores Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota e a Prof.ª Dr.ª Elizabeth Sampaio de Medeiros por colaborar de forma inestimável na realização de parte da pesquisa.

A toda minha família que são os motivos pelo qual sigo nesta caminhada. Agradeço por todo amor, apoio e dedicação e por serem tudo em minha vida. Amo vocês.

Aos meus amigos de Laboratório que acompanharam e colaboraram durante todo o processo, em especial a Ivanildo, pela parceira durante os experimentos, por toda experiência e ensinamentos a mim oferecidos pela ajuda na obtenção de dados e por todo apoio insubstituível, e a todos os demais amigos que compõem o grupo de pesquisa do LECA. Obrigada por tudo.

Aos todos os familiares e demais amigos que ficaram felizes com aprovação no programa de Pós-Graduação.

Aos integrantes da banca examinadora. Meu muito obrigado.

À CNPq, CAPES e UFRPE pelo apoio financeiro como auxílio indispensável no desenvolvimento desta pesquisa.

Sou grata a todos!

Eu te darei uma oferta de gratidão e a ti
farei as minhas orações.
Salmos 116:17

RESUMO

A Mastite Bovina (MB) é uma inflamação no tecido do úbere que afeta a produção do leite. Os principais agente etiológicos causadores da MB são bactérias patogênicas, e seu principal tratamento é feito por meio de antibioticoterapia, mas, o uso indiscriminado desses medicamentos tem favorecido a seleção de bactérias com mutações que as tornam resistentes, além de aumentar o risco de resíduos desses compostos no leite. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de produtos antimicrobianos nanoencapsulados em quitosana produzidos a partir da combinação de óleos essenciais de plantas comerciais utilizadas no tratamento de mastite bovina. Trinta cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas e coletadas de leite de bovinos diagnosticados com mastite foram avaliadas quanto à resistência a diferentes tipos de óleos essenciais com possível atividade antimicrobiana através do método de disco-difusão. Entre os demais óleos testados os que apresentaram resultados consistentes e eficientes foram os OEs de capim-limão, tomilho e orégano. Os testes de concentração inibitória mínima (MIC) foram realizados e tiveram seus valores definidos variando de 0,313 mg/mL a 1,250 mg/mL, para confirmar a atividade antibacteriana dos óleos, em seguida a sinergia da atividade antimicrobiana dos diferentes OEs associados foi analisada pelo delineamento simplex-centroid-design como base para avaliar a interação entre os compostos químicos, e indicou que os óleos de orégano e tomilho combinados apresentaram resultados mais consistentes contra as quatro cepas de *S. aureus*. A partir desses resultados foi produzido um creme contendo a mistura desses óleos no qual sugere-se que seja considerado um percentual de 75% de orégano e 25% de tomilho na composição para otimizar a atividade antimicrobiana da mistura dos óleos. Posteriormente, nanopartículas foram produzidas por processo de nanoprecipitação por agitação magnética contendo uma solução de quitosana em ácido acético. As nanopartículas produzidas apresentaram-se homogêneas, fluídas, sem alteração de cor e odor e tamanho de 43 nm a 220 nm caracterizando-se assim como nanopartículas. Os valores de PDI variaram de 0,08 mV a 0,2 mV o que indica boa dispersão das nanopartículas, já o potencial zeta (ζ - mv) apresentou valores de -1,48 mV a 6,47mV, considerando o potencial zeta com carga negativa de - 297 mV da *S. aureus*, é sugerido que as nanopartículas com carga positiva sejam utilizadas

como alternativa antimicrobiana, por eliminar possíveis repulsões eletrostáticas entre a nanopartícula e a *S. aureus* permitindo assim a inibição da bactéria. Além disso as nanopartículas poderão ser incorporadas na base do creme permitindo assim uma liberação controlada desses OEs no sítio de ação desejado.

PALAVRAS-CHAVE: Óleos essenciais, *Staphylococcus aureus*, Quitosana, Nanotecnologia, Antibacteriano.

ABSTRACT

Bovine Mastitis (BM) is an inflammation of the udder tissue that affects milk production. The main etiological agents causing MB are pathogenic bacteria, and their main treatment is through antibiotic therapy, but the indiscriminate use of these drugs has favored the selection of bacteria with mutations that make them resistant, in addition to increasing the risk of residues of these compounds in milk. Therefore, the present work aimed to develop antimicrobial products nanoencapsulated in chitosan produced from the combination of essential oils from commercial plants used in the treatment of bovine mastitis. Thirty strains of Staphylococcus aureus isolated and collected from milk from bovines diagnosed with mastitis were evaluated for resistance to different types of essential oils with possible antimicrobial activity using the disk-diffusion method. Among the other oils tested, the ones that presented consistent and efficient results were the EOs of lemongrass, thyme and oregano. Minimum inhibitory concentration (MIC) tests were performed and their values were defined ranging from 0.313 mg/mL to 1.250 mg/mL, to confirm the antibacterial activity of the oils, then the synergy of the antimicrobial activity of the different associated EOs was analyzed by the simplex-centroid-design design as a basis for evaluating the interaction between the chemical compounds, and indicated that the combined oregano and thyme oils showed more consistent results against the four strains of S. aureus. From these results, a cream was produced containing the mixture of these oils in which it is suggested that a percentage of 75% of oregano and 25% of thyme be considered in the composition to optimize the antimicrobial activity of the mixture of oils. Subsequently, nanoparticles were produced by nanoprecipitation process by magnetic stirring containing a solution of chitosan in acetic acid. The produced nanoparticles were homogeneous, fluid, without color and odor change and size from 43 nm to 220 nm, thus characterizing themselves as nanoparticles. The PDI values ranged from 0.08 mV to 0.2 mV, which indicates good dispersion of the nanoparticles, while the zeta potential (ζ - mv) presented values from -1.48 mV to 6.47 mV, considering the zeta potential with negative charge of -297 mV of S. aureus, it is suggested that nanoparticles with positive charge be used as an antimicrobial alternative, by eliminating possible electrostatic repulsions between the nanoparticle and S. aureus, thus allowing the inhibition of the bacterium. In

addition, the nanoparticles can be incorporated into the base of the cream, thus allowing a controlled release of these EOs at the desired site of action.

KEYWORDS: Essential oils, *Staphylococcus aureus*, Chitosan, Nanotechnology, Antibacterial.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1.

Tabela 1. Análise da formação de halo (diâmetro) em teste de disco difusão em ágar contra cepas de *S. aureus*.....60

Capítulo 2.

Tabela 1. Composição das fases aquosas e oleosas das nanopartículas.....76

Tabela 2. Diferentes proporções dos surfactantes utilizados na preparação das nanopartículas. Siglas: O1 - Orégano 1, O2 - Orégano 2, O3 - Orégano 3, T1 - Tomilho 1, T2 - Tomilho 2, T3 - Tomilho 3, C1 - Capim-limão 1, C2 - Capim-limão 2, C3 - Capim-limão 3, OEs - Óleos essenciais, Tween 80 - Polisorbato 80, Span 80 - Monooleato de Sorbitano.....77

Tabela 3. Aspectos organolépticos decorrentes das diferentes proporções dos surfactantes utilizados na preparação das nanopartículas. Siglas: O1 - Orégano 1, O2 - Orégano 2, O3 - Orégano 3, T1 - Tomilho 1, T2 - Tomilho 2, T3 - Tomilho 3, C1 - Capim-limão 1, C2 - Capim-limão 2, C3 - Capim-limão 3.....78

Tabela 4. Análise das características físico-químicas das nanoemulsões. Siglas: O1 - Orégano 1, O2 - Orégano 2, O3 - Orégano 3, T1 - Tomilho 1, T2 - Tomilho 2, T3 - Tomilho 3, C1 - Capim-limão 1, C2 - Capim-limão 2, C3 - Capim-limão 3, PDI - Índice de Polidispersão, ζ - Potencial Zeta.....79

Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e percentual de inibição das Nanopartículas revestidas de quitosana contendo óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon flexuosus* e *Origanum vulgare* contra cepas de *Staphylococcus aureus*. As quatros cepas de *S. aureus* testadas foram identificadas como: Cepa 285, Cepa 311, Cepa 330 e Cepa 335.....81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CH – Quitosana

MB – Mastite Bovina

MC – Mastite Clínica

MS – Mastite Subclínica

NPs – Nanopartículas

OE – Óleo Essencial

OEs – Óleos Essenciais

SLC – Sistemas de Liberação Controlada

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....16
2. REVISÃO BILIOGRÁFICA.....17
2.1. Mastite Bovina.....17
2.2. *Staphylococcus aureus*.....19
2.3. Principal medida de tratamento e controle da Mastite Bovina.....20
2.4. Óleos Essenciais.....21
2. 5. *Cymbopogon flexuosus* (Capim-Limão).....21
2.6. *Thymus vulgaris* (Tomilho).....22
2.7. *Origanum vulgare* (Orégano).....23
2.8. *Mentha piperita* (Hortelã-Pimenta).....24
2.9. *Syzygium aromaticum* (Cravo).....25
3.0. *Melaleuca alternifolia* (Árvore do Chá).....26
3.1. *Piper nigrum* (Pimenta preta).....26
3.2. *Attalea speciosa* (Babaçu).....27
3.3. *Syagrus coronata* (Licuri).....28
3.4. *Citrus aurantium* (Laranja de Sevilha).....28
3.5. Sistemas de Liberação controlada (SLC).....29
3.6. Nanopartícula.....29
3.7 Quitosana.....30
4. OBJETIVOS.....31
4.1. Objetivo Geral.....31
4.2. Objetivos Específicos.....31
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....32
Capítulo 1 – Patente
1. Campo da Invenção.....42
2. Antecedentes da Invenção.....42
3. Descrição da Invenção.....55
4. Reivindicações.....64
5. Resumo.....65
Capítulo 2 – Patente
1. Campo da Invenção.....66
2. Antecedentes da Invenção.....66

3. Descrição da Invenção.....74
4. Reivindicações.....83
5. Resumo.....85
6. CONCLUSÃO.....86
7. Anexos.....87

1. INTRODUÇÃO

A Mastite Bovina (MB) é caracterizada por uma inflamação no tecido do úbere ocasionada por infecção patogênica e por danos físicos e químico, podendo afetar a produção do leite, trazendo a perdas financeiras consideráveis (ASHRAF, IMRAN, 2020). Os principais agente etiológicos causadores da MB são bactérias patogênicas que naturalmente se espalham através de roupas de cama de gado contaminadas, maquinários, mãos, entre outros (ANGELOPOULOU et al., 2019). O tratamento em casos de MB bacteriana é realizado, principalmente por meio de antibioticoterapia, mas o uso indiscriminado desses medicamentos tem favorecido a seleção de bactérias com mutações que as tornam resistentes, além de aumentar o risco de resíduos desses compostos no leite (SILVA et al., 2018). Nesta circunstância, faz-se necessária a elaboração de novos tratamentos eficazes contra a mastite bovina, objetivando a substituição ou redução da utilização de antibióticos.

Tratamentos à base de fitoterápicos tem despertado bastante interesse, devido à grande variedade de plantas e seus derivados que têm apresentado efeitos biológicos significativos, além disso as fitoterapias são um elemento primordial na medicina etnoveterinária (MUSHTAQ et al., 2018). Neste sentindo, os óleos essenciais (OEs) são compostos aromáticos voláteis extraídos de plantas, que apresentam uma ação antimicrobiana (HOFFMANN, 2020) tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novos tratamentos contra mastite. Os OEs podem servir de matriz para a produção de nanopartículas e, o desenvolvimento de nanopartículas contendo estes compostos naturais pode substituir a utilização de antibióticos tradicionais.

Os Sistemas de Liberação Controlada (SLC) possuem muitas vantagens, e as nanopartículas podem compor um SLC de fármaco, e adquirir vantagens terapêuticas, no qual, além de aperfeiçoar a eficácia do fármaco e melhorar a adesão, reduz o número de aplicações dele, podendo causar menos estresse ao animal (WU et al., 2020). Nestes SLCs, o princípio ativo fica mais protegido da degradação e/ou inativação; pode melhorar a sua biodisponibilidade por aumento da penetração celular e proporcionar a liberação do fármaco no sítio de ação desejado, eliminando ou minimizando os efeitos colaterais da terapêutica convencional (YADAV et al., 2020). As nanopartículas são formadas por polímeros sintéticos, semi-sintéticos ou naturais que encapsulam a molécula do

medicamento e variam de 10 a 1000 nm de diâmetro (OTI, 2020; SHENDE, GUPTA, 2020). Uma molécula bastante utilizada como material de revestimento em SLC de fármacos é a quitosana. Este é um polissacarídeo natural, produzido a partir da desacetilação da quitina sendo um polímero de grande importância econômica e ambiental, muito abundante na natureza a partir de subprodutos da indústria pesqueira, de baixo custo, biodegradável e renovável (MATOS et al., 2020). Além disso, a quitosana é uma molécula que possui atividade antimicrobiana, cicatrizante, antioxidante entre outras (MATICA et al., 2019).

Portanto, em uma nanopartícula de OE revestida com quitosana, o princípio ativo é liberado de forma gradativa, desta forma é possível reduzir o número de aplicações e, consequentemente, os efeitos colaterais e a toxicidade (BATISTA, PEPE, 2014). Além disso, o uso de diferentes OEs juntos pode potencializar o efeito antimicrobiano de ambos, ou seja, possuir efeito sinérgico, desta forma, reduzindo a dose necessária para o tratamento. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de produtos antimicrobianos nanoencapsulados em quitosana produzidos a partir da combinação óleos essenciais de plantas comerciais comumente utilizados no tratamento de mastite bovina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mastite Bovina

A origem mais considerável de perdas econômicas na moderna indústria de laticínios é a Mastite Bovina (MB), que é caracterizada como uma inflamação na glândula mamária provocada principalmente por diferentes espécies de bactérias, além de fungos, algas e vírus (MOTAUNG et al., 2017; BENIĆ et al., 2018). A MB é classificada como Mastite Clínica (MC) e Mastite Subclínica (MS), e é responsável por inúmeros prejuízos econômicos em consequência da redução na produção de leite, despesas médicas veterinárias e em alguns casos o abate do animal (SHAHEEN et al., 2016; MAITY et al., 2020). A MB também está ligada a outros problemas de saúde em vacas, como a redução de ingestão de ração e distúrbios reprodutivos, que pode refletir na redução da produção de leite (BENIĆ et al., 2018).

Há milhares de anos, a proximidade exigida pela ordenha manual possibilitou a identificação de anormalidade na glândula mamária e no leite de vacas, no entanto pouco se sabia sobre o manejo e as causas da mastite (RUEGG, 2017). Um melhor entendimento sobre a mastite só foi possível após o desenvolvimento de microscópios que possibilitaram a detecção dos microrganismos conhecidos como os principais agentes etiológicos (RUEGG, 2017).

Os principais agentes etiológicos causadores da mastite bacteriana são *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma spp*, *Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus uberis*, bactérias coliformes e outras bactérias gram-negativas, como *Klebsiella pneumoniae e Escherichia. coli* (EL-SAYED e KAMEL, 2021). Esses patógenos são classificados em dois grupos diferentes, sendo eles contagiosos e ambientais, resultando em formas de MC e MS com sérias consequências econômicas para a indústria de laticínios (MOTAUNG et al., 2017). Os agentes contagiosos são introduzidos através de ordenha por meio de equipamentos ou pelas mãos dos ordenhadores, já os ambientais são comumente encontrados no local onde os animais são criados como também em material vegetal, esterco, roupas de cama de gado ou em fontes de água contaminada (MOTAUNG et al., 2017). Sendo assim, como o ambiente animal é rico em microrganismos, o leite é um meio ideal para o crescimento de uma infinidade de bactérias (BENIĆ et al., 2018).

O diagnóstico da mastite é fundamentando em testes bacteriológicos e contagens de células somáticas (BENIĆ et al., 2018). Na MC o diagnóstico não é difícil uma vez que as modificações clínicas são visíveis e a composição química do leite modificada, permitindo que o produtor identifique o problema e a necessidade de tratamento, diferentemente da MS que é assintomática e não apresenta alterações na composição do leite e nem sinais clínicos nos animais (BENIĆ et al., 2018). O controle da MB depende da higienização do úbere, do ambiente, das máquinas de ordenha ou mãos dos ordenhadores, da redução da exposição dos tetos aos patógenos e do aumento da resistência das vacas à infecção, da desinfecção das instalações e do descarte regular e adequado dos excrementos, essas medidas têm evidenciado a redução do risco de mastite ambiental e mastite contagiosa. (SHAHEEN et al., 2016).

2.2 Staphylococcus aureus

O *Staphylococcus aureus* pertencente à família Staphylococcaceae de ordem Bacillales e classe Bacilli, é um microrganismo anaeróbio facultativo, oxidase-negativa, e catalase positiva, globular não móvel e não formador de esporos, que se fragmenta em mais de um plano configurando cachos irregulares em forma de uva, seu envelope celular apresenta ácido teicóico da parede de ribitol e ácido lipoteicóico de glicerol aportado na membrana (FOSTER; GEOGHEGAN, 2015).

Bactéria oportunista gram-positiva com grande potencial patogênico o *S. aureus* constantemente é encontrado de forma assintomática na pele de humanos e animais em membranas nasais, sendo considerado como um importante patógeno nosocomial (MEHRAJ et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018). Em pele saudável o *S. aureus* não causa infecções, contudo sua entrada na corrente sanguínea e em tecidos internos pode ocasionar uma diversidade de infecções graves, uma vez que o *S. aureus* é associado a uma diversidade de infecções invasivas, superficiais e eventualmente fatais (MEHRAJ et al., 2016; TAYLOR, UNAKAL., 2021).

A capacidade de seleção dessas bactérias com mutações que as tornam resistentes e o potencial de *S. aureus* em formar biofilmes são as principais razões que estabelecem o desafio de lidar com essas infecções (OLIVEIRA et al., 2018). O sucesso como patógeno e a habilidade infecciosa de *S. aureus* estão associados aos fatores de virulência, no qual destacam-se a produção de uma ampla diversidade de toxinas extracelulares; bem como hemolisinas e leucocidinas, toxinas esfoliativas, enterotoxinas estafilicócicas e a toxina da síndrome do choque 1 (TSST-1) (OLIVEIRA et al., 2018; ABRIL et al., 2020).

O *S. aureus* é um contaminante de alimentos, considerado como principal patógeno de origem alimentar que causa problemas de saúde em humanos e animais (ABRIL et al., 2020). Além disso o *S. aureus* destaca-se como o principal agente etiológico causador da mastite bovina, esse patógeno gera prejuízos econômicos em função da queda na qualidade e produção do leite, além disso a ingestão de leite ou de seus derivados contaminados podem provocar a transferência de genes de resistência para humanos (SILVA et al., 2018). Os obstáculos encontrados no tratamento da mastite bovina ocasionada por *S. aureus* envolve o acelerado aparecimento de multirresistência, o provável

desenvolvimento de infecções ininterruptas, repetidas e crônicas por geração de parasitismo intracelular facultativo e biofilme (ALGHARIB et al., 2020).

2.3 Principal medida de tratamento e controle da Mastite Bovina

Desde a segunda guerra mundial, o uso de antibióticos tem solucionado quase todas as doenças infecciosas enfrentada pelo homem e por animais (EL-SAYED e KAMEL, 2021). Assim também é com a MB, em que o uso de antibióticos é utilizado como uma das principais medidas para controle, tratamento, e profilaxia no período de secagem (ALGHARIB et al., 2020; ANGELOPOULOU et al., 2019). Os principais antibióticos utilizados no tratamento da mastite bovina são: amoxicilina, gentamicina, ampicilina, tetraciclina, eritromicina, penicilina entre outros (MAIA et al., 2018; ABDALHAMED et al., 2018).

A eficácia dos medicamentos depende da seriedade da doença, da escolha do medicamento, da proibição de causas predisponentes e da utilização e dosagens dos medicamentos (ALGHARIB et al., 2020). No tratamento da mastite bovina os efeitos dos antibióticos dependem da absorção e distribuição do medicamento quando administrado intramamariamente, da sua farmacocinética, da sua penetração no leite quando introduzido por via parenteral, entre outros (ALGHARIB et al., 2020).

Uma enorme desvantagem na utilização de antibióticos no tratamento da mastite é que o leite precisa ser retido por alguns dias em virtude dos resíduos de antibióticos no leite (ANGELOPOULOU et al., 2019). Além disso, há o surgimento de bactéria multirresistentes que resultam em consequências econômicas e financeiras, devido ao tratamento não eficiente e disseminação de bactérias resistentes a medicamentos de animais para animais (ABDALHAMED et al., 2018). Em consequência dessas desvantagens, os tratamentos tradicionais com uso de antibióticos estão pouco a pouco sendo substituídos por tratamentos alternativos (PASCA et al., 2020). Diversas abordagens alternativas estão agora em produção para substituir os antibióticos no controle e prevenção da mastite (EL-SAYED e KAMEL, 2021).

2.4 Óleos Essenciais (OEs)

Também denominados óleos voláteis ou óleos etéreos, os óleos essenciais (OEs) fazem parte de um grupo de substâncias secundárias de origem vegetal, cujo nome “óleo essencial” é dado em virtude de serem responsáveis pelo aroma característico da planta (HOFFMANN., 2020). Os OEs são extraídos especialmente de cascas de frutas de plantas aromáticas, sementes, folhas, flores, cascas, rizomas e compostos de inúmeros elementos químicos voláteis, compreendendo álcoois, ésteres, terpenóides, cetonas, éteres e aldeídos (ZHANG e YAO, 2019). A extração desses OEs pode ocorrer por destilação, outros através de extração com um solvente como dióxido de carbono supercrítico ou hexano, e até mesmo por compressão mecânica dos tecidos vegetais (HOFFMANN., 2020).

Os OEs são comumente utilizados na aromaterapia para atenuar os sintomas de ansiedade (ZHANG e YAO, 2019). Desde a antiguidade os OEs de plantas medicinais tem sido muito utilizado para tratar doenças em virtude de seus efeitos antimicrobianos (GALOVICOVÁ et al., 2021), e por apresentarem propriedades antiparasitária, antifúngica, antiviral, antibiofilme, anticâncer, antioxidante, antibacteriano entre outros diversos efeitos (ADUKWU et al., 2016).

Inúmeros OEs foram identificados por muitas agências regulatórias internacionais de aditivos alimentares e por diversos países como GRAS – Geralmente Reconhecido como Seguro, entretanto, alguns elementos dos OEs são regulamentados de forma distinta em diferentes países (JU et al., 2019). As aplicações e uso comercial desses compostos tem crescido significativamente, no qual os OEs são muito utilizados em alimentos, no manejo de infecções animais, na perfumaria, como inseticidas, limpeza doméstica, em lenços desinfetantes e cosméticos, porém, a toxicidade e bioatividade dos OEs ainda é pouco conhecida (ADUKWU et al., 2016). No momento presente, há uma predisposição de crescimento da resistência aos antibióticos de muitos microrganismos, sendo indispensável buscar compostos alternativos para eliminá-los (GALOVICOVÁ et al., 2021).

2.5 Cymbopogon flexuosus (Capim-Limão)

O *Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats., muito conhecido como capim-limão é uma planta cultivada especialmente em regiões tropicais e subtropicais,

tendo a Índia como maior produtora do mundo (CHOUDHARY et al., 2020; MUKARRAM et al., 2021a). Pertencente à família Poaceae, o *C. flexuosus* é uma gramínea perene aromática que apresenta um rápido crescimento, cultivada especialmente por seu óleo essencial, e por apresentar grande importância comercial em razão de suas amplas aplicações em múltiplas áreas (MUKARRAM et al., 2021b). Extraídos das folhas, o óleo essencial de capim-limão é usado em indústria alimentícia, de medicamentos, farmacêutica e cosmética em virtude de seu aroma, além de apresentar atividade antifúngica, anticancerígena e antimicrobiana (AZEVEDO et al., 2016; MUKARRAM et al., 2022). Em estudos realizados por Azevedo et al. (2016) o OE de *C. flexuosus* demonstrou atividade antimicrobiana inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O principal componente biologicamente ativo do OE de *C. flexuosus* é o citral, que é uma combinação de dois aldeídos monoterpênicos acíclicos isoméricos (geranial e neral) (GAO et al., 2020). O OE de capim-limão e o citral presente em sua composição dispõem de um considerável potencial para aplicações farmacêuticas em tratamentos de infecções provocadas por biofilmes polimicrobianos (GAO et al., 2020).

2.6 Thymus vulgaris (Tomilho)

O *Thymus vulgaris* é uma planta aromática conhecida como tomilho, originária do Mediterrâneo e de países vizinhos, pertencente à família Lamiaceae, comumente plantada na primavera em solos bem drenados, podendo ser cultivada em locais quente e ensolarado, sendo capaz de sofrer intensos congelamentos (KUETE et al., 2017; DAUQAN e ABDULLAH, 2017). O *T. vulgaris* há séculos vem sendo utilizado na medicina tradicional por seus efeitos antiinflamatórios e antimicrobianos (GALOVICOVÁ et al., 2021), antioxidante, antiespasmódico, antifúngico, antibacteriano, antiviral, e também em indústrias alimentícias e aromáticas como intensificador de sabor em uma grande diversidade de bebidas, alimentos, confeitarias, e como conservante de alimentos (KUETE et al., 2017). Assim como a planta, o óleo essencial de tomilho também tem aplicações medicinais (DAUQAN e ABDULLAH, 2017). Os principais componentes encontrados no OE de *T. vulgaris* são o timol, linalol, carvacrol, terpinen-4-ol, γ-terpineno, β-mirceno e o p-cimeno (DAUQAN e ABDULLAH, 2017). O *T. vulgaris* apresenta grande potencial curativo

relacionado a presença do timol, carvacrol, flavonóides, fenóis e eugenol, mas, é o timol e o carvacrol os componentes mais importantes encontrado em *T. vulgaris,* estando associados *a* atividade antimicrobiana de óleo de tomilho (DAUQAN e ABDULLAH, 2017; FANI e KOHANTEB, 2017). As folhas de *T. vulgaris* são excelentes fontes de cálcio, ferro, magnésio, potássio, selênio e manganês, além disso o *T. vulgaris* apresenta um dos maiores níveis de antioxidantes, muito rico em vitamina C e A, e contém minerais vitais para uma boa saúde (DAUQAN e ABDULLAH, 2017).

Em estudo realizado por Souza et al. (2020) foi observado que o óleo de *T. vulgaris*, apresenta atividade antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Sendo assim, devido a suas propriedades, sua eficácia contra bactérias associadas a mastite e seu potencial antioxidante, o OEs de *T. vulgaris* pode ser utilizado no desenvolvimento de formulação farmacêutica como uma alternativa a terapia convencional de mastite (KOVACEVIC et al., 2021).

2.7 Origanum vulgare (Orégano)

O *Origanum vulgare* conhecida popularmente como orégano, é uma planta aromática originária dos solos secos e rochosos do Mediterrâneo, muito utilizada como planta medicinal, especiaria e como fonte bem definida de importantes medicamentos à base de plantas na fitoterapia moderna (TALEB et al., 2018; LOMBREA et al., 2020). Pertencente à família Lamiaceae, o *O. vulgare* apresenta-se como uma planta perene com caules herbáceos, base lenhosa, folhas opostas em formato de ovo e pequenas flores agrupadas em inflorescências (LOMBREA et al., 2020; KOVACEVIC et al., 2021).

Os principais componentes do OE de *O. vulgare* são o Carvacrol, Timol, Germacreno D, Linalol, γ-Terpineno, β-Cariofileno e o p-Cimeno (LOMBREA et al., 2020). Mas *O. vulgare* é uma espécie bastante variável, sendo assim, a composição de seu OE varia conforme a área geográfica, o clima, estágio de maturação da planta, época de colheita e condições ambientais (LOMBREA et al., 2020). O principal efeito farmacológico ligado ao OE de *O. vulgare* é a atividade antimicrobiana, que está relacionada a rica presença do timol e carvacrol, caracterizando uma eficaz alternativa como agente antimicrobiano contra cepas de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (LOMBREA et al.,

2020). A atividade antioxidante, citotóxica e antibacteriana do OE de *O. vulgare* também está associada a presença dos mesmos compostos (COCCIMIGLIO et al., 2016). Além disso, em virtude da presença do carvacrol, o óleo essencial de orégano apresenta efeitos antitumorais, diminui a expressão de genes inflamatórios e citocinas pró-inflamatórias (LOMBREA et al., 2020).

Em estudo realizado por Kovacevic et al. (2021), devido à presença do timol e carvacrol, o OE de *O. vulgare* apresentou um bom potencial antimicrobiano contra patógenos comumente encontrados na mastite, sendo ele *Escherichia coli*, *Streptococcus spp, Staphylococcus spp* e *Staphylococcus spp* coagulase negativa. Levando em consideração a atividade antimicrobiana do OE de O. *vulgare* contra patógenos associados a mastite, o OE de *O. vulgare* representa uma provável solução no tratamento desta infecção, e o seu uso pode ser empregado na descoberta de novas táticas não antimicrobianas e como terapia adicional ou de substituição ao tratamento antibiótico convencional (KOVACEVIC et al., 2021). Deste modo, o rápido e consistente efeito antimicrobiano do OE de *O. vulgare* faz com que o óleo seja um candidato favorável para o desenvolvimento de tratamentos alternativos (VASCONCELOS et al., 2019).

2.8 Mentha piperita (Hortelã-Pimenta)

Erva glabra, perene e com aroma forte, a *Mentha piperita*, conhecida popularmente como hortelã-pimenta, é uma planta da família Lamiaceae extremamente cultivada por causa do seu valor comercial e aroma característico em países como os Estados Unidos, índia, Ásia, África e Europa (MAHENDRAN E RAHMAN, 2020). A *M. piperita*, apresenta flores roxas com forma de espirais, caule liso podendo crescer de 30 a 100 cm de altura, folhas de 4 a 9 cm de comprimento e 1,5 a 4 cm de largura (ANWAR et al., 2019).

O uso da *M. piperita* é bastante relatado em aromatizantes, cosméticos, preparações farmacêuticas e na medicina tradicional, uma vez que inúmeras partes da *M. piperita* têm sido utilizadas para fins benéficos (MAHENDRAN E RAHMAN, 2020). Além disso a *M. piperita* é bastante utilizada no tratamento de diversas doenças como antidiabético, antipirético, anticancerígeno, larvicida e pesticida, para inflamação na garganta, distúrbios digestivos, febre, tosse e

resfriados, pois apresenta efeito de broncodilatador, como espasmódico/antiespasmódico e antifúngico (ANWAR et al., 2019).

O óleo essencial *M. piperita* também tem sido muito descrito devido a seus importantes efeitos biológicos, no qual apresenta atividade antioxidante, antialérgica, antiviral, antiinflamatória e anti-hipertensiva (MAHENDRAN E RAHMAN, 2020). Além disso, o óleo essencial de *M. piperita* apresentam atividade antimicrobiana contra leveduras e bolores, e contra diversas espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas, ainda o efeito antimicrobiano apresentado pelo óleo essencial de *M. piperita* também é promissor em produtos lácteos (ABDOLSHAHI et al., 2018). Esses efeitos do óleo essencial de *M. piperita* estão diretamente relacionados a presença de metabólitos especializados, como terpenóides, compostos químicos como o ácido rosmarínico, álcoois e fenólicos antioxidantes (ANWAR et al., 2019).

2.9 Syzygium aromaticum (Cravo)

Conhecido popularmente como cravo, o *Syzygium aromaticum* é uma planta aromática da família Myrtaceae considerada como uma das mais valiosas e importante especiarias no comércio mundial (KAUR E KAUSHAL, 2018). O *S. aromaticum* é amplamente cultivado em diversos países como a Índia, Madagascar e Indonésia, e por apresentar diferentes épocas de colheitas em países distintos, o *S. aromaticum* pode ficar disponível durante todo o ano (KAUR E KAUSHAL, 2018).

O óleo essencial de *S. aromaticum* é muito utilizado no tratamento de feridas e queimaduras, e como analgésico em tratamentos de dores de dente e atendimentos odontológicos, ainda seu uso tem sido muito relatado em diversas aplicações industriais, bem como na produção de sabonetes e perfumes (BATIHA et al., 2020). Além disso o óleo essencial de *S. aromaticum* possui atividades anticancerígena, antiiflamatória, antitumoral, antiviral, antibacteriana, antifúngica, inseticida, herbicida e nematicida, antioxidante e antimicrobiana (KAUR E KAUSHAL, 2018; RADÜNZ et al., 2020). E em estudo realizado por Brudi et al. (2015) o óleo essencial de *S. aromaticum* apresentou forte atividade antibiofilme contra *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina subclínica.

Essas propriedades biológicas apresentadas pelo óleo essencial *S. aromaticum* estão associados a presença de compostos fenólicos e do eugenol (RADÜNZ et al., 2020). Estudos realizados por Kaur e Kaushal (2018) demonstraram através da técnica de cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) que o óleo essencial de *S. aromaticum* apresenta como composto majoritário o eugenol. Além disso, A análise fitoquímica do óleo essencial de *S. aromaticum* revelou a presença de flavonóides, taninos, saponinas, alcaloides, esteroides e glicosídeos (KAUR E KAUSHAL, 2018).

3.0 Melaleuca alternifolia (Árvore do Chá)

A *Melaleuca alternifolia* é uma planta da família Myrtaceae conhecida popularmente como árvore do chá, muito cultivada em diversos países da América do Sul, na Austrália e Índia (FELIPE et al., 2018). A *M. alternifolia* é muito utilizada na medicina popular por apresentar atividade antiviral, antibacteriana, anti-helmíntica, antifúngica, antitumoral, antimicrobiana e antiinflamatória (FELIPE et al., 2018; CAPETTI et al., 2020).

O óleo essencial (OE) da *M. alternifolia* é amplamente utilizado em vários países no tratamento de diversas doenças e infecções cutâneas, e na fabricação de produtos de higiene (BRUN et al., 2019). O OE de *M. alternifolia* pode ser extraído através da hidrodestilação de suas folhas, além do mais a composição química do OE de *M. alternifolia* pode variar conforme a região de cultivo e método de extração (FELIPE et al., 2018). O OE de *M. alternifolia* apresenta mais de 100 componentes químicos em sua composição, como compostos fenólicos, monoterpenos e sesquiterpenos, e dentre esses, o componente majoritário presente no OE de *M. alternifolia* é o terpinen-4-ol (CORDEIRO et al., 2020). A atividade antimicrobiana e antibacteriana, além da capacidade de apresentar atividade antibiofilme contra algumas bactérias é associada a presença do terpinen-4-ol, o que também destaca o potencial do OE de *M. alternifolia* em aplicações na prática clínica (CORDEIRO et al., 2020).

3.1 Piper nigrum (Pimenta preta)

O *Piper nigrum* é uma espécie de planta da família Piperaceae, nativo da índia, conhecido como pimenta preta ou pimenta do reino, muito utilizado no mundo, e tem como característica principal um sabor forte atribuído a presença

da piperina (HAQ et al., 2021; TURRINI et al., 2020). O *P. nigrum* apresenta uma ampla gama de aplicações, normalmente o seu fruto é muito utilizado para condimentos e especiarias, mas, está planta também é muito utilizada na medicina tradicional para tratar diversas doenças desde gripe, febre, constipações, dores musculares e complicações gastrointestinais (SALEHI et al., 2020; TURRINI et al., 2020).

A piperina presente no *P. nigrum* apresenta atividade antioxidante, antienvelhecimento, antialérgica, antiproliferativo, antidiabético, propriedades hepatoprotetoras, neuroprotetoras, antitumoral, cardioprotetor, antiangiogênese, antiobesidade, antimicrobiano, antiiflamatória e efeitos imunomoduladores (HAQ et al., 2021). A piperina é o principal componente responsável pela maior parte dos efeitos terapêuticos do *P. nigrum*, e auxilia na digestão, estimulando as enzimas pancreáticas e intestinais, aumenta a biodisponibilidade oral de muitos medicamentos, nutrientes e vacinas aumentando seus efeitos terapêuticos, e inibe diversas enzimas metabólicas (SALEHI et al., 2020). Além disso, o óleo essencial de *P. nigrum* é rico em proantocianidinas, flavonóides e fenólicos totais, e apresenta potencial de eliminação de radicais livres e peroxidação lipídica (ZHANG et al., 2020).

3.2 Attalea speciosa (Babaçu)

A *Attalea speciosa*, conhecida popularmente como babaçu é uma palmeira que pertence à família Arecaceae, comumente encontrada na Caatinga, na Amazônia e na Mata Atlântica brasileira (SANTOS et al., 2020). Pode apresentar de 10 a 30 metros de altura, caule com 20 a 50 cm de diâmetro, e o fruto é constituído pelo mesocarpo, amêndoa e casca (SANTOS et al., 2020; FAKHOURI et al., 2021). Diversos subprodutos podem ser feitos a partir das partes da *A. speciosa*, que podem ser utilizado de formas distintas, e assim colaborar com o desenvolvimento econômico das comunidades (FAKHOURI et al., 2021). *A. speciosa* é utilizada na indústria de cosméticos, artesanato, nutrição, na produção de medicamento, de biodiesel e na construção movelaria (SANTOS et al., 2020).

A semente da *A. speciosa* é composta em grande parte por lipídio, e o óleo de *A. speciosa* é composto especialmente por ácidos graxos e triglicerídeos, sendo eles os ácidos palmítico, oleico, linoleico, láurico, mirístico e esteárico

(BURLANDO E CORNARA, 2017). Algumas partes da *A. speciosa,* como o mesocarpo, é muito utilizado no tratamento de doenças devido à presença de flavonóides, taninos e saponinas, além disso a farinha do mesocarpo da *A. speciosa* apresenta atividade cicatrizante, imunomoduladora, antitrombótica, antitumoral e antiiflamatória (SOARES et al., 2020).

O extrato etanólico adquirido da farinha do mesocarpo possui propriedades antimicrobiana contra diversos tipos de bactérias gram-positivas como exemplo da *Enterococcus faecalis* e da *Staphylococcus aureus*, além disso o OE de *A. speciosa* é bastante utilizado para tratar infecções cutâneas, hemorroidas e inúmeros processos inflamatórios (BARROQUEIRO et al., 2020; ARAÚJO et al., 2016).

3.3 Syagrus coronata (Licuri)

O *Syagrus coronata* é uma planta endêmica da caatinga brasileira, pertencente à família Arecaceae, popularmente conhecida como licuri ou ouricuri, muito utilizada na recuperação de áreas degradadas, e com grande importância ecológica, cultural e socioeconômica (MEILI et al., 2016; SILVA et al., 2019).

Devido a suas propriedades, o *S. coronata* é muito utilizado no tratamento de diversas doenças como dores na coluna, inflamações oculares, micoses e na cicatrização de feridas (SANTOS et al., 2019). O óleo essencial de *S. coronata,* é um importante derivado dessa planta, cuja produção pode chegar a 99 milhões de toneladas por ano (MEILI et al., 2016). O óleo essencial de *S. coronata* apresenta propriedades cicatrizante, antiiflamatória, antifúngica, além de atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas como a *Staphylococcus aureus* (BESSA et al., 2016).

3.4 Citrus aurantium (Laranja de Sevilha)

O *Citrus aurantium* é uma planta perene da família Rutaceae, cujo crescimento pode chegar até 5 metros de altura, com flores brancas aromática, conhecida popularmente como bigarade, laranja azeda, laranja amarga ou laranja de sevilha (SUNTAR et al., 2018; MAKSOUD et al., 2021). Os compostos presentes em *C. aurantium* são responsáveis por diversos efeitos benéficos a saúde (SUNTAR et al., 2018).

A casca, as folhas, flores, sementes, frutos e o óleo essencial de *C. aurantium* são muito utilizados em aplicações médicas, na indústria de alimentos e confeitaria, cosméticos e perfumes (MANNUCCI et al., 2018). Além disso o óleo essencial de *C. aurantium* apresenta propriedade ansiolítica, antioxidantes, pesticida, anticancerígena, antidiabética, antiobesidade, e atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positiva, que associada com a propriedade antioxidante possibilita sua aplicação como conservante natural, colaborando no aumento da segurança de alimentos (SUNTAR et al., 2018; TENEVA et al., 2019).

3.5 Sistemas de Liberação Controlada (SLC)

Os Sistemas de Liberação Controlada (SLC) são novos métodos que tem como principais objetivos um maior controle da liberação do princípio ativo e dos níveis do fármaco no sítio de ação desejado, um melhor direcionamento do princípio ativo a alvos específicos com altas concentrações do fármaco no local a ser tratado, redução de doses tóxicas e subterapêuticas, redução do intervalo das dosagens e efeitos colaterais indesejados (BIZERRA e SILVA, 2016). Nanopartículas como nanocápsulas e nanoesferas, e em vesículas, como os lipossomas podem apresentar características de SLC (JAIN, THAREJA, 2019).

Os SLC apresentam muitas vantagens em comparação com os métodos de dosagens convencionais, pois além de reduzir os efeitos colaterais e melhorar a eficácia do fármaco nos pacientes, também pode melhorar a aceitação dos pacientes ao medicamento (WU et al., 2020).

3.6 Nanopartículas (NPs)

Os progressos atuais em nanotecnologia são numerosos, no entanto, as mais estudadas e conhecidas são as nanopartículas (NPs) (GARZÓN, 2018). As NPs são compostas de polímeros sintéticos, semi-sintéticos ou naturais de ordem nanométrica, cujas dimensões estão entre 10 a 1000 nm, muito utilizadas como transportadoras farmacêutica, com aplicações em terapia e em diagnósticos (NAJAHI-MISSAOUI et al., 2020; OTI, 2020).

As NPs normalmente apresentam-se em formato de nanoesferas e nanocápsulas, e tem como principais características serem biocompatíveis e biodegradáveis (MELO et al., 2020). As nanoesferas são representantes dos

sistemas matriciais ou monolíticos, em que o fármaco está homogeneamente adsorvido ou incorporado na estrutura de um polímero ou de uma junção de polímeros de propriedades e composição química variáveis. Já as nanocápsulas são tidas como reservatório, em que é formada por um núcleo comportando o fármaco que pode estar no estado líquido ou sólido, neste cenário o princípio ativo é revestido por uma parede permeável ou membrana polimérica (BIZERRA; SILVA, 2016). Sendo assim, na área da biotecnologia, as NPs têm sido bastantes utilizadas na fabricação de biossensores, na administração de fármacos, na análise biomédica entre outros (GARCIA et al., 2021).

3.7 Quitosana (CH)

A quitosana (CH) é um polissacarídeo alcalino natural e renovável que apresenta boas propriedades de adsorção e hidratação, e não possui efeitos colaterais e nem toxicidade (WANG et al., 2020). É obtida a partir da desacetilação da quitina, extraída de alguns fungos e crustáceos (SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2019), e é um dos biopolímero de carboidrato biocompatível e biodegradável mais úteis na ciência farmacêutica, em que apresenta muitos benefícios, sobretudo na segurança e aumento da eficácia dos produtos farmacêuticos (SHARIATINIA, 2019). Além disso, apresenta capacidade de encapsular substâncias ativas hidrofóbicas e hidrofílicas, e também uma maior estabilidade terapêutica contra degradação química e enzimática, maior biodisponibilidade e impacto do fármaco no órgão alvo (SHARIATINIA, 2019).

A CH pode ser utilizada como material antibacteriano, e material de revestimento para encapsular vários agentes bioativos, além disso é o candidato predileto na preparação de curativos hidrogel por causa de suas magníficas características biológicas capazes de promover a cicatrização de feridas (SHARIATINIA, 2019). A CH possui propriedades antimicrobiana, antiiflamatória, analgésica, hemostática, mucoadesiva e filmógena, e devido as suas propriedades químicas e física únicas, seu uso é considerado seguro em aplicações farmacológicas, biomédicas e em tratamentos de águas residuais, além disso, a CH e seus derivados são uma fonte favorável, eficaz e segura na produção de sistemas de liberação controlada de fármacos (MATICA et al., 2019; ABDEL-HACK et al., 2020).

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Desenvolver produtos antimicrobianos nanoencapsulados em quitosana e produzidos a partir da combinação de óleos essenciais de plantas comerciais utilizadas no tratamento de mastite bovina.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de Óleos Essenciais (OEs) combinados, assim como observar se há efeitos sinérgicos entre eles;
- Desenvolver e caracterizar nanopartículas de quitosana como Sistema de Liberação Controlada (SLC) de OEs;
- Desenvolver produto farmacoterápico com OEs livres e combinados;
- Depositar um pedido de patente contendo óleos essenciais a partir de seus efeitos sinérgicos.

5. Referências Bibliográficas

ABDALHAMED, A. M. et al. Isolation and identification of bacteria causing mastitis in small ruminants and their susceptibility to antibiotics, honey, essential oils, and plant extracts. *Veterinary World*, v. 11, n. 3, p. 355-362, 2018.

ABDEL-HACK, M. E. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. International Journal of Biological Macromolecules, v. 164, p. 2726–2744, 2020.

ABDOLSHAHI, A. et al. Antibacterial activity of some Lamiaceae species against *Staphylococcus aureus* in yoghurt-based drink (Doogh). *Cellular and Molecular Biology*., v. 64, n. 8, 2018.

ABRIL, A. G. et al. *Staphylococcus aureus* Exotoxins and Their Detection in the Dairy Industry and Mastitis. *Toxins*, v. 12, n. 537, 2020.

ADUKWU, E. et al. Antimicrobial activity, cytotoxicity and chemical analysis of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and pure citral. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 22, p. 9619–9627, 2016.

ALGHARIB, S. A. et al. Nanoparticles for treatment of bovine *Staphylococcus aureus* mastites. *Drug Delivery*, v. 27, n. 1, p. 292-308, 2020.

ANGELOPOULOU, A. et al. Non-antibiotic microbial solutions for bovine mastitis – live biotherapeutics, bacteriophage, and phage lysins. Critical Reviews in Microbiology, p. 1-17, 2019.

ANWAR, F. et al. *Mentha*: A genus rich in vital nutra-pharmaceuticals: A review. *Phytotherapy Research*., p. 1–23, 2019.

ARAÚJO, F. R. et al. Ethnobotany of babaçu palm (*Attalea speciosa* Mart.) in Tucuruí Lake Protected Areas Mosaic – eastern Amazon. *Acta Botânica Brasilica*, v. 30, n. 2, p. 193-204, 2016.

ASHRAF, A; IMRAN, M. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Animal Health Research Reviews*, p. 1–14, 2020.

AZEVEDO, I. L. et al. Eficácia *in vitro* do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus* steud. Wats.) Frente a bactérias entéricas de origem avícola. *Acta veterinaria brasilica*, v.10, n.1, p. 25-31, 2016.

BARROQUEIRO, E. S. B. et al. Immunomodulatory and Antimicrobial Activity of Babassu Mesocarp Improves the Survival in Lethal Sepsis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*., v. 2016, p. 1-7, 2016.

BATIHA, G. E. et al. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities. *Biomolecules*., v. 10, n. 202, 2020.

BATISTA, A. J. S; PEPE, V. L. E. Os desafios da nanotecnologia para a vigilância sanitária de medicamentos. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 19, n. 7, p. 2105–2114, 2014.

BENIĆ, M. et al. Bovine mastitis: a persistent and evolving problem requiring novel approaches for its control - a review, Veterinarski Arhiv, v. 88, n. 4, p. 535-557, 2018.

BESSA, C. M. A. S. et al. *Syagrus coronata* seed oils have antimicrobial action against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Plants Research*., v. 10, n. 23, p. 310-317, 2016.

BIZERRA, A; SILVA, V. Sistemas de Liberação Controlada: Mecanismos e aplicações. *Revista Saúde e Meio Ambiente*, v, 3, n. 2, p. 1-12, 2016.

BRUDI, P. E. et al. Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in

Staphylococcus aureus strains isolated from milk of cows with mastites. *Journal of Dairy Science*., v. 98, n. 9, 2015.

BRUN, P. et al. In Vitro Antimicrobial Activities of Commercially Available Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Essential Oils. Current Microbiology., v. 76, p. 108–116, 2019.

BURLANDO, B; CORNARA, L. Revisiting Amazonian Plants for Skin Care and Disease. *Cosmetics*., v. 4, n. 25, 2017.

CAPETTI, F. et al. *Melaleuca alternifolia* Essential Oil: Evaluation of Skin Permeation and Distribution from Topical Formulations with a Solvent-Free Analytical Method. *Planta Medica*., 2020.

CHOUDHARY, S. et al. Effects of boron toxicity on growth, oxidative damage, antioxidante enzymes and essential oil fingerprinting in *Mentha arvensis* and *Cymbopogon flexuosus. Chem. Biol. Technol. Agric*, v. 7, n. 8, 2020.

COCCIMIGLIO, J. et al. Antioxidant, Antibacterial, and Cytotoxic Activities of the Ethanolic *Origanum vulgare* Extract and Its Major Constituents. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p. 1–8, 2016.

CORDEIRO, L. et al. Terpinen-4-ol as an Antibacterial and Antibiofilm Agent against *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Mol. Sci*., v. 21, n. 4531, 2020.

DAUQAN, E. M. A; ABDULLAH, A. Medicinal and Functional Values of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb. *Journal of Applied Biology & Biotechnology,* v. 5, n. 2, p.17-22, 2017.

EL-SAYED, A; KAMEL, M. Bovine mastitis prevention and control in the post-antibiotic era. *Tropical Animal Health and Production*, v. 53, n. 236, 2021.

FAKHOURI, F.M et al. *Attalea speciosa* (*Orbignya phalerata*). In: Freitas de Lima, F., Lescano, CH, Pires de Oliveira, I. (eds) Frutos do Cerrado Brasileiro, Springer, Cham., p. 125-139, 2021.

FANI, M; KOHANTEB, J. In Vitro Antimicrobial Activity of *Thymus vulgaris* Essential Oil Against Major Oral Pathogens. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, v. 22, n. 4, p. 660-666, 2017.

FELIPE, L. O. et al. Lactoferrin, chitosan and *Melaleuca alternifolia*: natural products that show promise in candidiasis treatment. *Brazilian Journal of Microbiology*., 2017.

FOSTER, T. J; GEOGHEGAN, J. A. *Staphylococcus aureus*. *Molecular Medical Microbiology*, p. 655–674, 2015.

GALOVICOVÁ, L. et al. *Thymus vulgaris* Essential Oil and Its Biological Activity. *Plants*, v. 10, n. 1959, 2021.

GAO, S. et al. Antimicrobial Activity of Lemongrass Essential Oil (*Cymbopogon flexuosus*) and Its Active Component Citral Against Dual-Species Biofilms of *Staphylococcus aureus* and Candida Species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, 2020.

GARCIA, D. G. et al. Síntese de Nanopartículas de Prata pela Técnica de Eletrodeposição para Desenvolvimento de Biossensores. *Brazilian Journal of Development,* v.7, n.3, p. 31130-31145, 2021.

GARZÓN, M. G. Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, v. 27, n. 2, 2018.

HAQ, L. et al. Piperine: A review of its biological effects. *Phytotherapy Research*., p. 1–21, 2020.

HOFFMANN. K. H. Essential oils. *Z. Naturforsch*, v. 75, n. 177, p. 7–8, 2020.

JAIN, A. K; THAREJA, S. In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 47, n. 1, p. 524-539, 2019.

JU, J. et al. Application of essential oil as a sustained release preparation in food Packaging. *Trends in Food Science & Technology*, v. 92, p. 22–32, 2019.

KAUR, K; KAUSHAL, S. Phytochemistry and pharmacological aspects of *Syzygium aromaticum*: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.,* v. 8, n. 1, p. 398-406, 2019.

KOVACEVIC, Z. et al. New Perspective of *Origanum vulgare* L. and *Satureja montana* L. Essential Oils as Bovine Mastitis Treatment Alternatives. *Antibiotics*, v. 10, n. 1460, 2021.

KUETE, V. African Medicinal Spices and Vegetables and Their Potential in the Management of Metabolic Syndrome. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, 2017.

LOMBREA, A. et al. A Recent Insight Regarding the Phytochemistry and Bioactivity of Origanum vulgare L. Essential Oil. *Int. J. Mol. Sci*, v. 21, n. 9653, 2020.

MAHENDRAN, G; RAHMAN, L. Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological updates on Peppermint (*Mentha* × *piperita* L.): A review. *Phytotherapy Research*., p. 1–52, 2020.

MAIA, N. L. et al. Synergism of Plant Compound With Traditional Antimicrobials Against *Streptococcus spp.* Isolated From Bovine Mastitis. *Front. Microbiol*. v. 9, n. 1203, 2018.

MAITY, S. et al. Quantitative alterations in bovine milk proteome from healthy, subclinical and clinical mastitis during *S. aureus* infection. *Journal of Proteomics*, v. 223, n. 103815, 2020.

MAKSOUD, S. et al. *Citrus aurantium* L. Active Constituents, Biological Effects and Extraction Methods. An Updated Review. *Molecules*., v. 26, 2021.

MANNUCCI, C. et al. Clinical Pharmacology of *Citrus aurantium* and *Citrus sinensis* for the Treatment of Anxiety. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*., v. 2018, p. 1-18, 2018.

MATICA, M. A. et al. Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action. *Int. J. Mol. Sci*, v. 20, n. 5889, 2019.

MATOS, T. N. et al. Uso de Quitosana Aplicada à Liberação Controlada de Fármacos: Uma Revisão Sistemática. *Rev. Virtual Quim*, v. 12, n. 3, p. 668-680, 2020.

MEHRAJ, J. et al. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Patterns in the Community. *How to Overcome the Antibiotic Crisis*, p. 55–87, 2016.

MEILI, L. et al. (*Syagrus coronata*) fiber: a novel biosorbent to remove methylene blue from aqueous solutions. *Water Science & Technology*., 2016.

MELO, R. L. F. et al. As nanopartículas como ferramentas biológicas: uma revisão exploratória. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 7, p. 1-18, 2020.

MOTAUNG, T. E. et al. Importance of bovine mastitis in Africa. *Animal Health Research Reviews*, v. 18, n. 1, p. 58–69, 2017.

MUKARRAM, M. et al. Irradiated chitosan (ICH): an alternative tool to increase essential oil content in lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*). *Acta Physiologiae Plantarum,* v. 44, n. 2, 2022.

MUKARRAM, M. et al. Silicon nanoparticles elicit an increase in lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats) agronomic parameters with a higher essential oil yield. *Journal of Hazardous Materials*, v. 412, 2021a.

MUKARRAM, M. et al. Lemongrass essential oil components with antimicrobial and anticancer activities. Preprints.org. 2021b.

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

NAJAHI-MISSAOUI, W. et al. Safe Nanoparticles: Are We There Yet?. *Int. J. Mol. Sci*, v. 22, n. 385, 2021.

OLIVEIRA, D. et al. *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. *Toxins*, v. 10, n. 252, 2018.

OTI, V. B. Nanoparticles and its implications in HIV/AIDS therapy. *Current Drug Discovery Technologies*, v. 17, n. 4, p. 448- 456, 2020.

PASCA, C. et al. Eficácia das formulações naturais na patologia da mastite bovina: solução alternativa para o tratamento com antibióticos. Journal of Veterinary Research, v. 64, n. 4, p. 523-529, 2020.

RADÜNZ, M. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. *Food Chemistry*., 2018.

RUEGG, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 12, p. 10381–10397, 2017.

SALEHI, B. et al. *Piper* Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. *Molecules*., v. 24, n. 1364, 2019.

SÁNCHEZ-MACHADO, D. I. et al. Chitosan. *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, p. 485–493, 2019.

SANTOS, B. S. et al. Anti-staphylococcal activity of *Syagrus coronata* essential oil: Biofilm eradication and in vivo action on *Galleria mellonela* infection model. *Microbial Pathogenesis*., v. 131, p. 150-157, 2019.

SANTOS, F. D. R. P. et al. Uso do óleo de coco babaçu (*Attalea speciosa*) como emoliente em formulação fitocosmética com ação hidratante. *Revista Cereus*., v. 12. n. 4, p. 2-13, 2020.

SHAHEEN, M. et al. A Treatise on Bovine Mastitis: Disease and Disease Economics, Etiological Basis, Risk Factors, Impact on Human Health, Therapeutic Management, Prevention and Control Strategy. *J Adv Dairy Res*, v. 4, n. 1, 2016.

SHARIATINIA, Z. Pharmaceutical applications of chitosan. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 263, p. 131-194, 2019.

SHENDE, P; GUPTA, H. Formulation and comparative characterization of nanoparticles of curcumin using natural, synthetic and semi-synthetic polymers for wound healing. *Life Sciences*, v. 253, 2020.

SILVA, J. et al. Natural Vs Managed Habitat: Effect Over the Seed-Predator Pachymerus nucleorum and Its Natural Enemies. *Neotropical Entomology*., v. 49, n. 1, p. 131–138, 2019.

SILVA, J. G.; ALCÂNTARA, A. M.; MOTA, R. A. Mastite bovina causada por *Staphylococcus spp*. resistentes à meticilina: revisão de literatura. *Pesquisa Veterinária Brasileira,* v 38, n. 2, p. 223-228, 2018.

SOARES, M. C. R. Effect of Babassu Mesocarp As a Food Supplement During Resistance Training. *J Med Food*., p. 1-11, 2020.

SOUZA, V. V. M. A. et al. Synergistic antimicrobial action and effect of active chitosan-gelatin biopolymeric films containing *Thymus vulgaris*, *Ocimum basilicum* and *Origanum majorana* essential oils against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus. Cell Mol Biol*, v. 66, n. 4, 2020.

SUNTAR, I. et al. An Overview on *Citrus aurantium* L.: Its Functions as Food Ingredient and Therapeutic Agent. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*., v. 2018, p. 1-12, 2018.

TALEB, M. H. et al. *Origanum vulgare L.* Essential Oil as a Potential Anti-Acne Topical Nanoemulsion—In Vitro and In Vivo Study. *Molecules*, v. 23, n. 2164, 2018.

TAYLOR, T. A; UNAKAL, C. G. *Staphylococcus aureus*. *StatPearls*, 2021.

TENEVA, D. et al Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial activity of essential oil from *Citrus aurantium* L zest against some pathogenic microorganisms. *Z. Naturforsch.*, 2019.

TURRINI, E. et al. Overview of the Anticancer Potential of the “King of Spices” *Piper nigrum* and Its Main Constituent Piperine. *Toxins*., v. 12, n. 747, 2020.

VASCONCELOS, N. G. et al. *Origanum vulgare L.* essential oil inhibits the growth of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 52, e20180502, 2019.

WANG, W. et al. Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine. *Int. J. Mol. Sci*, v. 21, n. 487, 2020.

WU, J. et al. Mechanism of a long-term controlled drug release system based on simple blended electrospun fibers. Journal of Controlled Release, v. 320, p. 337–346, 2020.

YADAV, N. et al, Potential of nano-phytochemicals in cervical cancer therapy. *Clinica Chimica Acta*, v. 505, p. 60–72, 2020.

ZHANG, C. et al. Antioxidant, hepatoprotective and antifungal activities of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. *Food Chemistry*, 2020.

ZHANG, N; YAO, L. Anxiolytic Effect of Essential Oils and Their Constituents: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019.

Capítulo 1

Patente a ser depositada no Instituto Nacional de Propriedades Intelectual – INPI
CREME COM ÓLEOS ESSENCIAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA INIBITÓRIA CONTRA *Staphylococcus aureus*

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da invenção

[001] O presente pedido de patente de invenção descreve um processo de obtenção de um creme contendo uma mistura de óleos essenciais com atividade antimicrobiana comprovada contra *Staphylococcus aureus* isolado de bovinos com mastite, sendo estes isolados obtidos de propriedades da bacia leiteira do estado de Pernambuco. O creme poderá ser utilizado no tratamento e controle de infecções causadas por *S. aureus*, pois utiliza matéria prima de fonte natural com atividade antimicrobiana livre de antibiótico. Esta invenção se situa no campo da biotecnologia aplicada a biociência animal.

Antecedentes da invenção

[002] A *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva que coloniza a pele e mucosas, em especial as narinas anteriores, de inúmeras espécies de animais e humanos, e é regularmente observada em ambientes hospitalares, sendo considerada como um significativo patógeno nosocomial (FOSTER E GEOGHEGAN, *Mol. Med. Microbiol.,* 655–674, 2015; MEHRAJ et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 55–87, 2016). Em pele saudável, o *S. aureus* não causa infecções, contudo sua entrada na corrente sanguínea e em tecidos internos, dependendo da predisposição do hospedeiro infectado e de características específicas relacionadas à virulência da bactéria, pode originar uma diversidade de infecções superficiais, invasivas e possivelmente fatais (FOSTER E GEOGHEGAN, *Mol. Med. Microbiol.*, 655–674, 2015; MEHRAJ et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 55–87, 2016).

[003] As infecções causadas por *S. aureus* vão desde infecções cutâneas do tipo erisipela, foliculite, abscessos, furúnculos, carbúnculos e celulite, até infecções invasivas que apresentam risco de vida como a endocardite, sepse, mastite, bacteremia, osteomielite, infecções de sítio cirúrgico e pneumonia (KARAUZUM et al., *Front Immunol.*, 12: 624310, 2021). Os sintomas das infecções ocasionadas por *S. aureus* são

provocados por toxinas, uma vez que este patógeno é capaz de produzir uma diversidade de proteínas extracelulares, conhecidas como exotoxinas, que compreendem as hemolisinas, leucocidinas e enterotoxinas (FOSTER E GEOGHEGAN, *Mol. Med. Microbiol.*, 655–674, 2015; ABRIL et al., *Toxins*, 12:9, 2020).

[004] As exotoxinas exercem papel no desenvolvimento das infecções de pele, inclusive na mastite em ruminantes produtores de leite, uma vez que o *S. aureus* destaca-se como principal agente causador de inflamação em glândulas mamárias causando mastite, e consequentemente cepas de *S. aureus* são capazes de estar presentes em produtos lácteos (ABRIL et al., *Toxins*, 12:9, 2020).

[005] A mastite bovina é uma inflamação nas glândulas mamárias que afeta as características do leite, e é a doença mais custosa da indústria de alimentos, resultando em perdas diretas e indiretas, afetando negativamente a econômica na indústria de laticínios (ASHRAF E IMRAN, *Trop. Anim. Health Prod.,* 50: 1193:1202, 2018).

[006] O consumo desses alimentos contaminados com *S. aureus* pode advir em surtos de intoxicação alimentar em humanos, por isso a rápida e precisa detecção dessas exotoxinas nas glândulas mamárias é fundamental, para que assim possa determinar o melhor tratamento para essa infecção e evitar grandes perdas econômicas na indústria de laticínios (ABRIL et al., *Toxins*, 12:9, 2020).

[007] Embora a antibioticoterapia seja a principal forma de lidar com infecções causadas por *S. aureus*, a terapêutica continua sendo um desafio, uma vez que o *S. aureus* tem potencial de tornar-se resistente a diversas classes de antibióticos clinicamente disponíveis, e esta resistência pode acontecer através de mutações ou por meio de aquisição de determinantes de resistência horizontalmente transferidos (VESTERGAARD et al., *Microbiol. Spectr.*, 7:2, 2019). Portanto, produtos e tratamentos alternativos que proponham a redução ou não utilização de antibióticos para tratar infecções ocasionadas por *S. aureus* podem ser uma excelente solução visando a eliminação de resíduos de antibióticos em produtos lácteos.

[008] Tratamentos à base de fitoterápicos tem provocado bastante interesse nas últimas décadas, pois diversos efeitos biológicos significativos têm sido relatados de uma grande variedade de plantas e seus derivados e, portanto. tornando-as candidatas ao desenvolvimento de novos produtos com aplicação, por exemplo, na medicina veterinária (MUSHTAQ et al., *Microb. Pathog., 114: 357–361*, 2018). Os fitoterápicos possuem uma

vantagem em relação aos antibióticos, pois, geralmente não induzem resistência em microrganismos mesmo depois de prolongada exposição (CHENG E HAN, *Asian-australas. J. Anim. Sci*., 33 (11):1699-1713, 2020). Neste sentido, fitoterápicos contendo óleos essenciais de plantas podem ser usados no tratamento de doenças causadas por *S. aureus*.

[009] Os óleos essenciais (OEs) são um conjunto de substâncias secundárias que têm origem vegetal, cujo denominação "óleo essencial" provém do fato de serem os responsáveis pela fragrância específica da planta (HOFFMANN et al., *Z. Naturforsch., C, J. Biosci., 75: 7-8,* 2020). Boa parte dos OEs podem ser adquiridos de diferentes partes da planta por destilação, outros são mecanicamente pressionados a partir de tecidos vegetais ou são extraídos com um solvente como por exemplo o hexano (HOFFMANN et al., *Z. Naturforsch., C, J. Biosci., 75: 7-8,* 2020). Os OEs apresentam benefícios terapêuticos, e são capazes de atuar individualmente ou em sinergia, com características antivirais, antibacterianas, antifúngicas e anti-inflamatórias (NECULAI-VALEANU et al., *Animals, 11(6), 1625,* 2021). As características antimicrobianas existentes em diversas plantas são devidamente descritas e os OEs e extratos vegetais são constantemente considerados seguros para humanos, animais e para o meio ambiente (LOPES et al., *Res. Vet. Sci*, 131: 186–193, 2020). Sendo assim, óleos essenciais que apresentem atividade antimicrobiana podem ser utilizados contra infecções causadas por *S. aureus*.

[0010] O *Cymbopogon flexuosus* é uma planta aromática, conhecida popularmente como capim-limão, pertencente à família Poaceae, e é muito cultivada por seu óleo essencial apresentar atividade inseticida, antimicrobiana e antioxidante, (GUNDEL et al., *Microb. Pathog*., 118: 268–276, 2018; MUKARRAM et al., *Acta Physiol. Plant*., 44:2, 2022). O *C. flexuosus* é uma gramínea perene, originária da Índia, mas também muito cultivada na África, China, América do Sul entre outros países, apresenta boas condições de crescimento em locais úmidos e ensolarados, podendo ser cultivada em uma diversidade de solos, geralmente com pH neutro, e sua propagação é realizada a partir de sementes (PREEDY, *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, *Elsevie*r., 2016). O OE de *C. flexuosus*, que pode ser adquirido de partes aéreas e das folhas da planta, é muito utilizado em cosméticos, na panificação, bebidas, produtos de higiene e na confeitaria (PREEDY, *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, *Elsevie*r., 2016).

[0011] O *Thymus vulgaris L. (Th.vu)* conhecido popularmente como tomilho é uma espécie de planta com flores da família Lamiaceae (HOSSEINZADEH et al., *Int. J. Clin.*

Med., 6: 635-642, 2015). O *T. vulgaris* apresenta propriedades antiinflamatória, antimicrobiana, antioxidantes, antiespasmódicas e imunomoduladoras, além de exercer efeitos benéficos em tratamentos de inúmeros distúrbios que afetam o sistema nervoso, cardiovascular e respiratório (SALEHI et al., *Phytother. res.,* 1–19, 2018). Entre as inúmeras espécies de *Thymus*, o *T. vulgaris* é mais utilizado dentre as espécies em medicamentos, na medicina tradicional é bastante cultivado em diversos países para tratar doenças referentes a inflamação, dores, inchaço muscular entre outros (HOSSEINZADEH et al., *Int. J. Clin. Med.,* 6: 635-642, 2015).

[0012] O *Origanum vulgare L*. mais conhecido como orégano é uma erva aromática, originária do Mediterrâneo e da Eurásia ocidental que pertence à família Lamiaceae, bastante utilizada no mundo como planta medicinal e especiaria, atuando como um remédio em inúmeros sistemas de cura tradicionais. Particularmente o OE de orégano tem sido abundantemente usado e, como resultado, também tem sido muito pesquisado (PEZZANI et al., *Phytochem Rev., 16(6): 1253–1268,* 2017). O OE de orégano possui características medicinais muito conhecidas como atividade antioxidante e antimicrobiana, e seu potencial antimicrobiano é capaz de inibir o crescimento de amostras bacterianas gram-positivas e negativas (ARAÚJO E LONGO, *Arq. Inst. Biol*., 83: 1-7, e0702014, 2016; NOBRE et al., *Braz. J. Dev.,* 7(4): 38712-38720, 2021).

[0013] A *Mentha piperita* conhecida popularmente como hortelã-pimenta é uma erva com ciclo de vida longo que pertence à família Lamiaceae, e tem como principal característica o seu aroma distinto (MAHENDRAN E RAHMAN, *Phytother Res*, 34(9):2088–2139, 2020). Por apresenta valor comercial, a *M. piperita* é uma planta muito cultivada na Ásia, índia, Estados Unidos, Europa e países mediterrâneos (MAHENDRAN E RAHMAN, *Phytother Res*, 34(9):2088–2139, 2020). Além do seu uso como aromatizante em alimento os OEs e extratos de *M. piperita* são muito utilizados para tratar algumas doenças como inflamação na garganta, febre, tosse, resfriados e distúrbios digestivos, devido ao seu efeito de broncodilatador, antipirético, espasmódico/antiespasmódico, antifúngico, antiinflamatório, antimicrobiano, antiviral, anticancerígeno, antidiabético, biopesticida e larvicida (ANWAR et al. *Phytother Res*, 1-23, 2019). Esses efeitos podem estar diretamente relacionados à presença de bioativos como terpenóides e substâncias aromáticas como aldeídos, álcoois e fenóis (MAHENDRAN E RAHMAN, *Phytother Res*, 34(9):2088–2139, 2020; ANWAR et al. *Phytother Res*, 1-23, 2019). Algumas espécies pertencentes à família Lamiaceae, como *M. piperita*, apresentam efeito antimicrobiano

contra uma enorme variedade de bactérias gram-negativas, leveduras e bolores, e bactérias gram-positivas como o *Staphylococcus aureus,* além disso a atividade antimicrobiana dessa família de OEs é promissora também em produtos lácteos (ABDOLSHAHI et al. *Cell. Mol. Biol,* 64(8), 2018).

[0014] O *Syzygium aromaticum* conhecido popularmente como cravo é uma planta aromática, que pertence à família Myrtaceae, muito cultivada em países tropicais e subtropicais (GONZÁLEZ et al. *Mol*, 26(21): 6387, 2021). O *S. aromaticum* é rico em antioxidantes e compostos voláteis como α-humuleno, eugenol e β-cariofileno (HARO-GONZÁLEZ et al. *Mol,* 26(21): 6387, 2021). O OE do *S. aromaticum* apresenta uma vasta aplicação na saúde, na medicina, em alimentos, como aromatizantes, em indústria de perfumes e cosméticos (GONZÁLEZ et al. *Mol*, 26(21): 6387, 2021). Além disso o OE de *S. aromaticum* apresenta atividades biológicas importantes que são associadas a presença de eugenol e outros compostos fenólicos, como atividade antioxidante, inseticida, antivirais, anticancerígenas, antifúngicas, antimicrobiana, e atua como bactericida contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes* (RADÜNZ et al. *Food Chem*, 2018; BATIHA et al*. Biomolecules, 10(2), 2020).*

[0015] A *Melaleuca alternifolia* conhecida popularmente como árvore do chá é uma planta arbustiva, nativa da Austrália, pertencente à família Myrtaceae, muito conhecida e comumente usada na medicina (SHAH E BAGHEL. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 14 (3): 1-11, 2017)*.* O OE de *M. alternifolia* é bastante utilizado em produtos para cuidados com a pele em razão de suas atividades biológicas onde apresenta atividades antifúngicas, anti-helmínticas, antivirais, antitumorais, antiinflamatórias e antimicrobianas (CAPETTI et al. *Planta Med*, 86(6):442-450, 2020; ASSIS et al. *Curr Pharm Des*, 26(33):4048-4055, 2020). Por esse motivo, o OE de *M. alternifolia* é bastante utilizado em diversos continentes como componente ativo em formulações de preparações tópicas, shampoos e limpeza das mãos para o tratamento de infecções cutâneas e outras doenças (BRUN et al. *Current Microbiology*, 76:108–116, 2019).

[0016] O *Piper nigrum* é uma erva perene nativa da costa de Malabar, na Índia, pertencente à família Piperaceae, e popularmente conhecida como pimenta preta ou pimenta do reino (ABDALLAH E ABDALLA. *J Bacteriol Mycol Open Access*, 6(2):141–145, 2018; TURRINI et al. *Toxins*, 12(747), 2020). O *P. nigrum* é rico em óleos essenciais, que pode ser extraído de sementes, frutos, galhos, folhas, raízes e caules (SALEHI et al.

Mol, 24(7):1364, 2019). O *P. nigrum* é considerado como o “rei das especiarias” devido a sua popularidade em uso para aromatizar alimentos e para fins medicinais em muitas partes do mundo desde os tempos antigos (ABDALLAH E ABDALLA. *J Bacteriol Mycol Open Access*, 6(2):141–145, 2018; SALEHI et al. *Mol*, 24(7):1364, 2019). O *P. nigrum* tem sido muito utilizado na medicina tradicional para tratar doenças de pele, fígado e estômago, problemas urológicos, para cicatrização de feridas, como agente antioxidante, antipirético, antiinflamatório, antifúngico, antibacteriano, além disso o *P. nigrum* apresenta potencial terapêutico contra inúmeras doenças crônicas, e sua atividade antimicrobiana também foi confirmada contra uma vasta gama de patógenos (SALEHI et al. *Mol*, 24(7):1364, 2019; TAKOOREE et al. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 1-34, 2019).

[0017] A *Attalea speciosa* é uma palmeira endêmica do Brasil encontrada principalmente nas bordas da floresta amazônica, pertence à família Arecaceae, e é conhecido popularmente como babaçu (SANTOS et al. *Evid. -Based Complementary Altern. Med*, 20: 1–10, 2020). A população faz amplo uso do mesocarpo da *A. speciosa* como medicamento, uma vez que a farinha do mesocarpo da *A. speciosa* apresenta propriedades biológicas com atividade imunomoduladora, antiinflamatória, cicatrizante, antitrombótica e antitumorais. (SOARES et al. *J Med Food*, 1–11, 2020). Além disso, o OE de *A. speciosa* é muito indicado para o tratamento de infecções cutâneas e diversos processos inflamatórios, e por apresentar atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-positivas como a *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (LIMA et al. *Braz. J. Dev,* , 6(7): 48639-48661, 2020; BARROQUEIRO et al. *Evid. -Based Complementary Altern. Med*, 16: 1-7, 2016).

[0018] O *Syagrus coronata* é uma planta oleaginosa comestível que produz grande quantidade de óleos, nativa da caatinga brasileira, pertencente à família Arecaceae, e popularmente conhecida como licuri ou ouricuri (SOUZA et al. *J Etnofarmacol*, 2021).O *S. coronata* apresenta grande potencial de uso para diversos fins em especial na medicina popular para tratar doenças como micoses, cicatrização de feridas, inflamações oculares e tratamento de dores na coluna (SANTOS et al. *Microb. Pathog*, 131: 150-157, 2019). O OE da semente de *S. coronata* apresenta forte atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, e o extrato oleoso de *S. coronata* é muito utilizado pela população do nordeste brasileiro por apresentar atividade antiinflamatória, antifúngica e cicatrizante (BESSA et al. *J. Med. Plant Res*, 10(23): 310–317, 2016).

[0013] O *Citrus aurantium* é uma planta popularmente conhecida como laranja amarga, laranja azeda ou laranja de sevilha, da família Rutaceae, amplamente utilizada na aromaterapia, em indústrias alimentícias, confeitarias, na perfumaria e cosméticos (MANNUCCI et al. *Evid. -Based Complementary Altern. Med*, 1-18, 2018). O *C. aurantium* possui grande potencial terapêutico com atividade antioxidante, antidiabética, anticancerígena, antiobesidade, ansiolítica e pesticida (SUNTAR et al. *Oxid. Med. Cell. Longev*, 1-12, 2018). O OE de *C. aurantium* apresenta diversos efeitos farmacológicos com extensa variação na composição química dependendo dos locais de cultivo, podendo apresentar em sua composição limoneno, linalol e *β* – mirceno (SUNTAR et al. *Oxid. Med. Cell. Longev*, 1-12, 2018). Além disso, o OE de *C. aurantium* apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, e essa atividade antimicrobiana juntamente com seu potencial antioxidante permite sua aplicação como conservante natural, contribuindo no aumento da segurança em alimentos (TENEVA et al. *Z Naturforschung C*, 2019).

[0014] Diante do exposto, o presente documento propõe a utilização de um creme e/ou pomada composto pela mistura de OEs de capim-limão, tomilho e orégano dentre outros OEs como um produto antimicrobiano utilizável na terapêutica para infecções causadas por *S. aureus*.

[0015] Embora existam documentos de patente que proponham produtos fitoterápicos contendo óleos essenciais aplicados a infecções causadas por *S. aureus*, não foram encontrados conflitos entre o atual pedido e outros encontrados na literatura. Contudo, é importante salientar as diferenças entre o presente documento e outros pedidos de patente.

[0016] O documento BR102020018323-0 refere-se a um pedido de patente de invenção para produto intramamário utilizado na prevenção, controle e tratamento da mastite aguda e crônica. O produto apresenta formulação composta pela associação de dois OEs sendo eles os óleos de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Melaleuca alternifolia* (melaleuca), com excipientes farmacêuticos aceitáveis e compatíveis com a formulação que propiciam o tratamento, controle e prevenção da mastite em animais domésticos. O documento difere da presente invenção tanto em termos de óleos essenciais usados na formulação quanto nos excipientes finais do produto farmacêutico.

[0017] O documento BR102021017441-2 refere-se a um produto intramamário veterinário para o tratamento, controle e prevenção de mastite em animais domésticos com formulação composta por óleos essenciais de *Lavandula angustifólia, Cymbopogon citratus, Cymbopogon flexuosus, Syzygium aromaticum, Copaifera reticulata, Cordia curassavica, Corymbia citriodora, Eucalyptus globulus, Zingiber officinalis, Ocimum sanctum, Origanum syriacum, Cymbopogon nardus, Lippia alba, Vetiveria zizanoides*plantas em doses de 0,1 à 100% (puro) e excipiente farmacêutico apropriado e compatível. O documento difere da presente, mesmo tendo em sua composição o OE de *Cymbopogon flexuosus*, não descreve a mistura deste com os OE usados na presente invenção. Ainda, ocorre diferença em sua composição para a formação do creme e nas suas propriedades terapêuticas já que não apresenta mistura com comprovada sinergia contra microrganismos causadores da mastite.

[0018] O documento US6106838 refere-se a um método para tratar e prevenir a coccidiose em aves de capoeira, e inflamação, infecção e diarreia em mamíferos compreendendo um OE de ervas que contém timol e carvacrol como seus principais ingredientes, especialmente o *Origanum vulgare spp. hirtum*. Embora o documento proponha um produto antimicrobiano composto por OE de orégano, neste documento não há relato da combinação do dito OE com outros OEs e não prevê a formulação de um creme ou pomada que possa ser aplicada de forma intramamária.

[0019] O documento US10406193 trata-se de uma composição para aplicação tópica com atividade antifúngica, contendo OE de árvore do chá (*Melaleuca alternifolia*), orégano (*Origanum vulgare*) e de lima (*Citrus limettiodes tanaka*) e um éster de vitamina E, para prevenção e tratamento de micoses da pele, e a sua composição é formulada como um gel hidrofóbico contendo pelo menos 3% dos óleos essenciais. O documento difere da presente invenção pois este propõe uma formulação antifúngica composta por OEs isolados em um gel hidrofóbico, não uma combinação de óleos com ação bactericida que possa ser aplicada por via intramamária.

[0020] O documento US8932655 refere-se a uma composição antiséptica aquosa para eliminar microrganismos como o *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Escherichia coli, Bacillus cereus* e *Candida albicans* que causam mastite bovina em animais leiteiros. A sua composição é formulada com agentes antimicrobianos que incluem produtos químicos como iodóferos, compostos de amônio quaternário, sais de clorexidina, compostos de liberação de cloro, compostos oxidantes, ácidos carboxílicos

protonados, aniônicos ácidos e dióxido de cloro, o OE de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, um antioxidante, cloreto de sódio e citrato de sódio como um eletrólito para reduzir a evaporação do óleo essencial, um ou mais agentes solubilizantes do tipo óxido de simetilamina, monolaurato de polioxetileno, éter monocetílico de polietilenoglicol 1000, polixietileno, monolaurato, laurilsulfato de sódio e sulfosuccinato de sódio-2-etilhexil, um óleo transportador podendo ser óleo mineral, óleo de miristato de isopropilo, óleo de palmitato de isopropilo, óleo de palma (*Elaeis guineensis*), óleo de girassol (*Helianthus annus*), azeite (*Olea europaea*), óleo de coco (*Cocos nucifera*), óleo de gergelim (*Sesamum idicum*) e óleo de soja (*Glycine max*), e um ácido orgânico como o ácido acético, ácido cítrico e ácido tartárico para ajustar o nível de pH da composição. O documento difere da presente invenção em termos de composição e dos OEs utilizados de forma isolada e dos excipientes farmacêuticos usados.

[0021] O documento WO2012/088568 refere-se a formas farmacêuticas fitoterápicas com atividade antimicrobiana utilizadas no tratamento de mastite bovina contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Cândida albicans*, cujo ingredientes ativos é composto por uma mistura de OEs de *Lippia solvifolia* e *Lippia sidoides,* Espessantes como carboximetilcelulose sódica e cálcica, álcool benzílico; parabenos, polímeros naturais como gomas: xantana, gelana, carragena, acácia, guar, esclerótium, de jataí, pectina e solventes sendo álcoois e/ou água. A presente invenção também trata do processo de preparação de tais composições e seus usos veterinários e difere da presente invenção em composição em relação aos OEs utilizados excipientes farmacêuticos.

[0022] O documento BR102013032750-6 refere-se a uma formulação farmacêutica e/ou cosmética composta do OE de *Cymbompogon densiflorus* caracterizado por ser obtido a partir da hidrodestilação de folhas e inflorescências, no qual apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos. Além disso, o documento também fornece a obtenção de nanoemulsões, contendo OE de *C. densiflorus* com concentração na faixa de 1,0 a 30,0%, contendo tensoativos compreendendo uma fase oleosa/tensoativo. O documento difere da presente invenção por não combinar os OEs utilizados e dos seus excipientes farmacêuticos.

[0023] O documento EP3419600A1 refere-se a uma composição tópica de ingredientes naturais de origem vegetal e animal para uso no tratamento e/ou profilaxia do úbere de mamíferos fêmeas, particularmente em animais leiteiros. A composição tópica apresenta

em sua composição 20-40% em peso de açúcar (preferencialmente a sacarose), 5-20% em peso de solução de ácido carboxílico (preferencialmente solução de ácido acético), 5-20% em peso de clara de ovo e 30-50% em peso de veículo, sendo este veículo gordura de porco, cera animal ou óleo de petróleo, e OEs de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), bálsamo do Peru (*Myroxylon balsamum*), óleo de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) óleo de rosa e similares, e suas misturas. O documento difere da presente invenção em termos de composição e dos OEs utilizados de forma isolada e dos excipientes farmacêuticos usados.

[0024] O documento KR20040084576A refere-se a preparação natural de um tratamento para mastite em úberes bovinos que pode ser injetado diretamente no ducto papilar de bovinos. A preparação natural apresenta um excelente efeito antibacteriano e inibe o crescimento de *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Escherichia coli*. O tratamento apresenta em sua composição 0,01-0,2% em peso de extrato de uva, 1-5% em peso de caseína, 0,01-0,2% em peso de lecitina, 0,1-0,5% em peso de poder de leite integral, 0,1-0,5% em peso de agente espumante e água esterilizada. O documento difere da presente invenção em termos de composição e excipientes farmacêuticos usados, e por não fazer uso de OEs de forma isolada e suas misturas em sua composição.

[0025] O documento US9968101B2 refere-se a composições compreendendo baixas concentrações de antimicrobianos eficazes de álcool benzílico (cerca de 0,1% (p/p)), sesquiterpenóides, como farnesol, nerolidol, bisabolol, apritona, citral e suas combinações (de cerca de 0,03% (p/p) a cerca de 2% (p/p)), um ou mais OEs como capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*), óleo de canela (*Cinnamomum glaucescens)*, óleo de tomilho (*Thymus vulgaris*) , óleo de galanga (*Alpinia galanga*), óleo de laranja (*Citrus sinensis*), óleo de romã (*Punica granatum*), óleo de folha de curry (*Murraya koenigii*), óleo de orégano (*Origanum vulgare*), óleo de alecrim (*Salvia rosmarinus*), e um ou mais extratos botânicos como extrato de wasabi, extrato de semente de toranja, extrato de semente de mel, extrato de cedro, extrato de romã, extrato de equinácea, extrato de casca de álamo, extrato de casca de salgueiro, extrato cítrico, extrato de Brahmi e suas combinações. Embora o documento proponha um produto antimicrobiano composto por OE de orégano, capim-limão e tomilho, este documento difere da presente invenção por não prevê a formulação de um creme ou pomada que possa ser aplicada de forma intramamária.

[0026] O documento US20160193232A1 descreve composições e métodos para tratar mastite causada por fungos e/ou prototecas, bactérias gram-positivas, bactérias gram-negativas, de compostos de ceragenina catiônicas e anfifílicas descrito como um antimicrobiano esteroide catiônico (CSA) que são compostos químicos de moléculas pequenas produzidos sinteticamente. Os compostos antimicrobianos de ceragenina descrito como agentes antimicrobianos, podem atuar como antibacterianos, antifúngicos e antivirais. Os compostos antimicrobianos de ceragenina liga-se à membrana celular de microrganismos, inserindo-se na membrana celular formando um poro que permite o vazamento de íons e materiais citoplasmáticos, essenciais para a sobrevivência levando à morte do microrganismo afetado. Estes compostos são administrados no órgão mamário de um mamífero ou localmente por injeção ou aplicação tópica. O documento difere da presenta invenção em termos de composição e excipientes farmacêuticos usados, e por não fazer uso de OEs de forma isolada e suas misturas em sua composição.

[0027] O documento RU2446814C2 descreve um método de seleção de probióticos que envolve estágios de isolamento de bactérias lácticas ou cepas de bactérias bífidas encontradas em leite fresco de mamífero por seleção em um meio de cultura de leite fermentado. A composição contém uma ou mais cepas probióticas na forma congelada, liofilizada ou seca, e a invenção proporciona uma prevenção ou tratamento mais eficaz de mastite em humanos ou animais contra *Staphylococcus aureus*, sem efeitos colaterais observados ao usar antibióticos para a mesma finalidade. O método para selecionar probióticos, parte do isolamento de cepas de bactérias do ácido lático ou bifidobactérias presentes no leite fresco de uma espécie de mamífero por seleção em um meio de cultura de ácido lático, em seguida a seleção das cepas que são capazes de serem transferidas para a glândula mamária após administração oral e/ou colonizar a glândula mamária após administração tópica, posteriormente a seleção das cepas que são capazes de reduzir o grau de sobrevivência e/ou o grau de adesão de *Staphylococcus aureus* nas células epiteliais, e pôr fim a seleção das cepas que são capazes de proteger os animais da mastite. O documento difere da presente invenção por não utilizar OEs, mais especificamente os OEs de orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*) em sua composição.

[0028] O documento CA2769627A1 descreve um creme tópico contendo agentes antimicrobianos como sais de prata que incluem sulfadiazina de prata, nitrato de prata,

carbonato de prata e óxido de prata, a combinação sinérgica de álcool benzílico e 1,3 propanodiol, octanodiol e decanodiol, utilizados no creme para aumentar a atividade antifúngica. O ácido cítrico e/ou ácido lático utilizado para auxiliar na liberação controlada de prata. outros agentes antimicrobianos como biguanidas (clorexidina ou polihexametileno biguanida), fenoxietanol, miconazol, polimixina, neomicina bacitracina e iodopovidona, sais de zinco e compostos de curcumina, óleo de calêndula (*Calendula officinalis),* capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*), canela (*Cinnamomum verum*), manjericão (*Ocimum basilicum*), citronela (*Cymbopogon nardus*), tomilho (*Thymus vulgaris*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), orégano (*Origanum vulgare*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), cravo (*Syzygium aromaticum*) os compostos orgânicos mentol, timol e eucaliptol. As composições descritas no documento podem ser usadas em produtos de cuidados pessoais, incluindo produtos para tratamento de feridas ou em uso veterinário. Embora o documento proponha um produto antimicrobiano composto por OE de orégano, capim-limão e tomilho, o documento difere da presente invenção em termos de composição e excipientes farmacêuticos usados.

[0029] O documento WO2012088568A1A descreve formas farmacêuticas fitoterápicas que possuem ação antimicrobiana para o contra microrganismos como *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*. compreendendo uma mistura de OEs de *Lippia solvifolia* e *Lippia sidoides*, sendo adequadas para o tratamento de mastite, em especial a mastite bovina. Estudos pré-clínicos e experimentos *in vitro* e *in vivo* foram realizados com uma forma farmacêutica elaborada com diferentes concentrações de ativos, e verificou-se que a concentração mais eficaz no controle de agentes de mastite compreendia pelo menos, 50% de timol e 5% de carvacrol resultante da combinação dos óleos essenciais de *Lippia salvifolia* e *Lippia sidoides*. O documento difere da presente invenção em termos de composição e excipientes farmacêuticos usados, e por não utilizar em sua composição os óleos essenciais de orégano, tomilho e capim-limão.

[0030] O documento WO2009108120A1 descreve uma composição antisséptica aquosa para eliminar microrganismos como o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Candida albicans* que causam mastite bovina em animais leiteiros. A composição compreende cerca de 10 a 50% em volume de óleo de capim-limão, e pelo menos um agente solubilizante podendo ser óleo mineral, óleo de miristato de isopropila, óleo de palmitato de isopropila, óleo de palma (*Elaeis guineenses*),

óleo de girassol (*Helianthus anmis*), azeite, óleo de coco (*Cocos nucifera*), óleo de gergelim (*Sesamum idicum*) e óleo de soja (*Glycine max*) para solubilizar o óleo de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*). A composição também compreende cerca de 10 a 30% em volume de um óleo transportador contendo os componentes da composição e cerca de 0,5 a 2% em volume de um eletrólito para fornecer condutividade à composição. A composição compreende ainda um ácido orgânico para ajustar o nível de pH da composição e um antioxidante. O documento difere da presente invenção em termos de composição e excipientes farmacêuticos usados, e por não utilizar em sua composição os óleos essenciais de orégano, tomilho.

[0031] O documento WO2010065747A3 descreve formulações veterinárias ou farmacêuticas compreendendo um ou mais óleos vegetais sendo eles óleo de tomilho (*Thymus vulgaris*), óleo de casca e óleo de folha de canela (*Cinnamomum verum*) e uma mistura dos mesmos, e subnitrato de bismuto e métodos para sua fabricação e usos. As formulações são uma pasta ou gel, úteis como selante de teto para prevenir ou tratar a mastite no tecido do úbere em um animal por meio de sua capacidade de formar uma barreira física para evitar a entrada de novas infecções bacterianas ou fúngicas e prevenir ativamente a entrada de bactérias ao redor ou através do meio do tampão do teto. O documento difere da presente invenção em termos de composição e excipientes farmacêuticos usados, e por não utilizar em sua composição os óleos essenciais de orégano, capim-limão.

[0032] O documento WO2001015680 descreve composições farmacêuticas que incluem extrato de óleo de plantas da família Labiatae uma grande família de ervas perenes, com cerca de 200 gêneros, como *Salvia* (sálvia), *Rosmarinus* (alecrim), *Mentha* (hortelã), *Ocimum* (manjericão), *Thymus* (tomilho), *Marrubium* (galgo), *Monarda* (hortelã), *Trichostema* (cachos azuis), *Teucrium, Hyptis, Physostegia, Lamium* (henbit), *Stachys*, *Scutellaria* (skullcap), *Nepeta* (catmint), e membros da família Verbenaceae que incluem *Lippia* (orégano mexicano) e *Lycopus*. As composições podem ser formuladas combinando extratos dos óleos essenciais de plantas da família Labiatae com um ácido orgânico ou um sal como exemplos do ácido cítrico, ácido propiônico, ácido fumárico, ácido fólico, ácido málico, ácido ortofosfórico, ácido acético, ácido lático, ácido butírico, ácido glutâmico, ácido aspártico e ácido fórmico. A atividade antimicrobiana descrita na composição farmacêutica do documento se deve à presença de fenóis orgânicos, como

isopropil-o-cresol, no extrato oleoso das plantas. O documento difere da presente invenção em termos de composição e excipientes farmacêuticos usados.

[0033] O documento RU2157697C2 descreve composições utilizadas para profilaxia e tratamento de distúrbios microbiológicos gastroentéricos e dermatológicos. As composições são baseadas em OEs extraídos do grupo de plantas que consiste em *Origanum vulgaris*, *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita*, *Thymus serpilum*, *Saturea hortensis*, *Saturea montana*, *Saturea subricata*, *Carum corticum*, *Thymus zugis*, *Ocimum gratisimum*, *Moransa pungtata*, *Mosla japonoica* e *Salvia officinalis*. O teor de óleo é de 1-15% em peso da massa total da composição que pode ser usada no tratamento contra piolhos, dermatite, acnes, coli-bacteriose, dermatomicose, suor, fungos nos pés, e doenças veterinárias, como exemplo da mastite e coccidiose, e garante evitar biorrecaídas tanto na carne e no leite de animais quanto no corpo humano e prevenir o desenvolvimento de resistência de microrganismos às composições farmacêuticas como um todo. O documento difere da presente invenção em termo de composição e excipientes farmacêuticos usados.

[0034] Diante do exposto neste antecedente de invenção, não foi encontrado no estado da técnica documento que antecipe os achados que serão revelados na presente invenção.

Descrição da Invenção

[0035] A presente invenção refere-se a uma formulação farmacêutica na forma de creme e/ou pomada contendo uma mistura de óleos essenciais (OEs) com comprovada atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Em resumo esta formulação contém uma combinação de óleos essenciais como agentes ativos e excipientes, podendo ser útil no tratamento e/ou prevenção de diversos tipos de infecções causadas por *S. aureus*.

[0036] A formulação poderá ser usada em mamíferos capazes de colonização por microrganismos, selecionado a partir do grupo que compreende preferencialmente os bovinos, mas, também poderá compreender outros animais de grande porte como bubalinos, caprinos e ovinos.

[0037] Este produto objetiva combater agentes bacterianos, tais como, cepas de *S. aureus* coagulase-positiva. Por exemplo, a formulação proposta neste documento

apresenta atividade antimicrobiana contra cepas de *S. aureus*, não se limitando apenas a esta espécie e família de microrganismo.

[0038] A formulação farmacêutica poderá compreender essencialmente na mistura sinérgica de óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus de* 1 a 20% (p/p); óleo de *Thymus vulgaris* de 1 a 30% (p/p); e óleo de *Origanum vulgare* de 1 a 50% (p/p) que apresentam comprovada atividade antimicrobiana contra *S. aureus* isolado da bacia leiteira do estrado de Pernambuco, tornando estes óleos potenciais fontes para o desenvolvimento de novos tratamentos contra muitos tipos de infecção causadas por esse microrganismo. Recomendamos o uso de OE de orégano ou a composição de 75% de orégano e 25% de capim limão conforme mostrado nos exemplos como excelente para o uso contra cepas de *S. aureus* conforme resultados, demonstrado nos exemplos a seguir.

[0039] Ainda, outros OEs como *Eucalyptus globulus, Mentha piperita, Syzygium aromaticum* e *Melaleuca alternifolia, Piper nigrum, Attalea speciosa e Syagrus coronata* podem ser usados em composições sinérgicas contra cepas de *S. aureus* já que apresentaram atividade antimicrobiana contra o dito microrganismo sendo estes resultados demonstrados nos exemplos a seguir.

[0040] De acordo com o fabricante (Lazlo Aromaterapia LTDA), o método de análise do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* foi realizado por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução, utilizando cromatógrafo a gás AGILENT 7820A. Utilizou-se um coluna Supelcowax-10 de 30 m x 0,2 mm x 0,2 µm (Supelco). As temperaturas da coluna foram 50 °C (3 min), e 3 °C /min a 200 °C. Com injetor de 200 °C, Split 1/50, e detector FID de 220 ºC. E com volume de injeção de 1 µL. A identificação foi confirmada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), e como resultado, observou-se que os componentes majoritários do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* são o neral com 28,6% e o geranial com 46%.

[0041] De acordo com o fabricante (Lazlo Aromaterapia LTDA), o método de análise do óleo essencial de *Thymus vulgaris* foi realizado por Cromatografia gasosa de alto desempenho, com o instrumento Shimadzu CGMS-QP2010 Ultra. Utilizou-se coluna ZB-5MS+, e Gás carreador (Hélio). Rampa de temperatura foi de 2 °C/min. E a preparação da amostra foi de aproximadamente 7% (p/v) em diclorometano. Como resultado,

observou-se que os componentes majoritários do óleo essencial de *Thymus vulgaris* são o timol com 29,51 % e o carvacrol com 28,15%.

[0042] De acordo com o fabricante (Lazlo Aromaterapia LTDA), o método de análise do óleo essencial de *Origanum vulgare* foi realizado por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução, utilizando Cromatógrafo a gás AGILENT 7820A. Com coluna RXi-5MS de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Restek). As temperaturas da Coluna foram de 50 °C (0 min), 3 °C /min a 220 °C. Com injetor de 220 °C, Split 1/50, e com detector FID de 240 ºC. E o volume de injeção foi de 1 µL (concentração 1.0 % em acetato de etila). Identificação confirmada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). Como resultado, observou-se que o componente majoritário do óleo essencial de *Origanum vulgare* é o timol com 39,7%.

[0043] De acordo com o fabricante (Lazlo Aromaterapia LTDA), o método de análise do óleo essencial de *Attalea speciosa* foi realizado por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução, utilizando uma coluna SP2380 de 30 m x 0,25 mm (Supelco). As temperaturas da Coluna foram 80 ºC (2 min), 7 ºC /min a 240 ºC. E o injetor com 260 ºC, Split: 1/100. E detector FID a 260 ºC. E com volume de injeção: 1 µL. Como resultado, observou-se que o componente majoritário do óleo essencial de *Attalea speciosa* é o ácido graxo C12:0 - láurico com 40,0%.

[0044] De acordo com o fabricante (Lazlo Aromaterapia LTDA), o método de análise do óleo essencial de *Syagrus coronata* foi realizado por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução, utilizando cromatógrafo a gás HP 7820A. Com uma coluna HP – Innowax de 15 x 0, 25 mm (HP). Com temperaturas da Coluna de 100 ºC (0 min), 7 ºC /min a 240 ºC. Com injetor de 260 ºC, Split: 1/30, e com detector FID de 260 ºC. O volume de injeção foi de 1 µL. Como resultado, observou-se que o componente majoritário do óleo essencial de *Syagrus coronata* é o ácido graxo C12:0 - láurico com 43,7%.

[0045] De acordo com o fabricante (Lazlo Aromaterapia LTDA), o método de análise do óleo essencial de *Citrus aurantium* foi realizado por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução, utilizando cromatógrafo a gás AGILENT 7820A. Com uma coluna RXi-5MS de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Restek). Com temperaturas da Coluna de 50 ºC (0 min), 3 ºC /min a 220 ºC. O injetor foi de 220 ºC, Split: 1/50, e o detector FID de 240 ºC. O volume de injeção foi de 1 µL (Com concentração de 1,0% em acetato de etila). Como

resultado, observou-se que o componente majoritário do óleo essencial de *Citrus aurantium* é o limoneno com 95,4%.

[0046] De acordo com o fabricante (Lazlo Aromaterapia LTDA), o método de análise do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* foi realizado por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução, utilizando om cromatógrafo a gás AGILENT 7820A. Com coluna RXi-5MS de 30 m x 0,25 µm (Restek). As temperaturas da Coluna foram 50 ºC (0 min), 3 ºC /min a 220 ºC. O injetor foi de 220 ºC, Split: 1/50, e o detector FID foi de 220 ºC. E o volume de injeção foi de 1 µL (amostra preparada a 2% m/v em acetato de etila). Como resultado, observou-se que o componente majoritário do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* é o eucaliptol com 75,7%.

[0047] De acordo com o fabricante (Lazlo Aromaterapia LTDA), o método de análise do óleo essencial de *Piper nigrum* foi realizado por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução, utilizando cromatógrafo a gás AGILENT 7820A. Com uma coluna HP-5, de 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm (AGILENT). As temperaturas da coluna foram de 50 ºC (0 min), 3 ºC /min a 200 ºC. Utilizou-se um injetor a 220 ºC, Split: 1/50, e detector FID a 220 ºC. E com volume de injeção de 1 µL (com concentração a 1,0 % em acetato de etila). Como resultado, observou-se que o componente majoritário do óleo essencial de *Piper nigrum* é o β-cariofileno com 25,5% seguido do limoneno com 19,8 %.

[0048] De acordo com o fabricante (Lazlo Aromaterapia LTDA), o método de análise do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foi realizado por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução, utilizando cromatógrafo a gás AGILENT 7820A. Com uma coluna RXi-5MS, de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Restek). As temperaturas da coluna foram de 50 ºC (0 min), 3 ºC /min a 200 ºC. Utilizou-se um injetor a 200 ºC, Split: 1/50, e um detector FID a 200 ºC. E com volume de injeção de 2 µL (amostra preparada a 2 % mv em acetato de etila). Como resultado, observou-se que o componente majoritário do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* é o terpinen-4-ol com 44,9 % seguido do γ-terpineno com 10,9 %.

[0049] De acordo com o fabricante (Lazlo Aromaterapia LTDA), o método de análise do óleo essencial de *Mentha piperita* foi realizado por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução, utilizando cromatógrafo a gás AGILENT 7820A. Com coluna de EC-WAX™, 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm (Alltech). As temperaturas da coluna de 50 ºC (0 min), 3 ºC /min a 200 ºC. Utilizou-se injetor de 200 ºC, Split: 1/50, e detector FID de 220 ºC. O volume de injeção foi de 2 µL (amostra preparada a 2 % mv em acetato de etila). Como

resultado, observou-se que o componente majoritário do óleo essencial de *Mentha piperita* é o mentol com 44,0% seguido da mentona com 17,1 %.

[0050] De acordo com o fabricante (Lazlo Aromaterapia LTDA), o método de análise do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* foi realizado por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução, utilizando cromatógrafo a gás HP 5890. Com coluna BP1 de 30 m x 0,25 mm (HP). Com temperaturas da Coluna de 50 ºC (1 min), 3 ºC /min, até 200 ºC. Com injetor de 200 ºC, Split: 1/50, e com detector FID de 220 ºC. E o volume de injeção foi de 1 µL (com concentração de 1,0 %) em clorofórmio). Como resultado, observou-se que o componente majoritário do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* é o eugenol com 88,5 %.

[0051] Nesta invenção poderá ser utilizado um conservante compreendido da classe dos parabenos para a formulação farmacêutica do creme/pomada, podendo ser utilizado o metilparabeno, propilparabeno, o etilparabeno e o butilparabeno, preferencialmente metilparabeno e propilparabeno compreendendo 0,01-1%.

[0052] Nesta invenção poderá ser utilizado como agente emoliente na formulação do creme/pomada o petrolato branco, lanolina líquida, cera branca, polietilenoglicol, cera autoemulsionante, álcool cetoestearílico, preferencialmente o petrolato branco 0,1-4%.

[0053] Poderá ser utilizado na formulação do creme/pomada um solvente compreendido na classe dos álcoois como o álcool etílico, álcool benzílico, álcool isopropílico, álcool metílico, preferencialmente o álcool benzílico 0,5-4% (p/p).

[0054] Para a formulação do creme/pomada poderá ser utilizado um agente de viscosidade compreendido na classe dos espessantes como a carboximetilcelulose, hidroxietilcelulose e alginato de sódio, preferencialmente o alginato de sódio 0,1-4% (p/p).

[0055] Uma vez que o pH do leite em caso de mastite torna-se alcalino devido às bactérias que acidificam o leite, e o organismo para compensar libera substâncias alcalinizantes, o solvente da formulação poderá ter a base água com pH ajustado num intervalo entre 6,5 e 7,5, preferencialmente 6,6 e 6,8 com a adição de um ácido biocompatível com o teto, como o ácido cítrico e lático, um tampão como o tampão citrato, fosfato de sódio, tris, citrato-fosfato, acetato de sódio e glicina-HCl, preferencialmente um tampão como fosfato de sódio 40-90% (p/p) (PERES et al., *Rev. Electron. de Vet*., n. 16, 2011).

[0056] Por fim, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus*, *Thymus vulgaris, Origanum vulgare, Eucalyptus globulus, Mentha piperita, Syzygium aromaticum* e *Melaleuca alternifolia, Piper nigrum, Attalea speciosa e Syagrus coronata* que serão utilizados na produção do creme/pomada foi realizada conforme descrito nos exemplos a seguir e também foi formulado um creme/pomada contendo a mistura sinérgica desses óleos essenciais.

Exemplo 1: Coleta e identificação de isolamento bacteriano

[0057] Trinta cepas de *S. aureus* foram coletadas e isoladas de leite dos bovinos diagnosticados com mastite na bacia leiteira do estado de Pernambuco. Todas as cepas foram avaliadas quanto à resistência a diferentes tipos de óleos essenciais com possível atividade antimicrobiana. Para isso foi realizado o método de disco-difusão seguindo a norma do Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (BRCAST, 2021). Foram utilizados os seguintes tipos de óleos essenciais: *Cymbopogon flexuosus*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Eucalyptus globulus, Mentha piperita, Syzygium aromaticum* e *Melaleuca alternifolia, Piper nigrum, Attalea speciosa, Syagrus coronata e Citrus aurantium.* As cepas testadas apresentaram total resistência aos óleos de *P. nigrum, A. speciosa, S. coronata e C. aurantium,* sendo então descartados para testes posteriores. Entre os demais óleos testados, os que apresentaram resultados consistentes e eficientes, semelhante ao grupo controle de antibióticos de uso tradicional, com maior e melhor atividade antimicrobiana foram os OEs de *C. flexuosus*, *T. vulgaris* e *O. vulgare*, apresentando os melhores resultados contra as cepas de *S. aureus* de acordo com a Tabela 1. Sendo assim, estes foram selecionados para determinação da concentração inibitória mínima (MIC) pela técnica de microdiluição em caldo.

[0058] Tabela 1. Análise da formação de halo (diâmetro) em teste de disco difusão em ágar contra cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas da bacia leiteira do estado de Pernambuco.

Antibióticos	**Média (mm) ± Desvio Padrão**
Gentamicina	23,90 ± 5,92
Neomicina	20,91 ± 6,18

Tetraciclina	26,45 ± 2,75
Óleos Essenciais (OEs)	**Média (mm) ± Desvio Padrão**
Capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*)	30,95 ± 6,41
Cravo (*Syzygium aromaticum*)	11,40 ± 1,70
Eucalipto (*Eucalyptus globulus*)	18,94 ± 4,12
Folha do chá (*Melaleuca alternifolia*)	16,43 ± 3,36
Hortelã-pimenta (*Mentha piperita*)	17,24 ± 7,79
Orégano (*Origanum vulgare*)	32,92 ± 7,39
Tomilho (*Thymus vulgaris*)	41,43 ± 8,33

Exemplo 2: Ensaio de concentração inibitória mínima (MIC)

[0059] Os testes de concentração inibitória mínima foram realizados seguindo a norma do Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (BRCAST, 2021). Portanto, os óleos testados foram diluídos de forma seriada em Mueller Hinton caldo, e foram testadas as concentrações decrescentes de 20,000, 10,000, 5,000, 2,500, 1,250 e 0,625 mg/mL de cada óleo. As soluções foram então diluídas em série ao longo da linha, deixando 2 colunas para controles positivos e negativos. Foram utilizados 10 µL de suspensão bacteriana (em salina) padronizada com a escala 0,5 de McFarland (1,5 x 10^8 UFC/mL) em cada poço. As placas foram incubadas em estufa a 37 ± 1 °C por 24 horas. Após a incubação as placas de microdiluição foram avaliadas visualmente e submetidas a uma leitura espectrofotométrica em um comprimento de onda de 540 nm. Esses testes foram realizados em triplicata, mas repetidos se discrepâncias fossem observadas.

[0060] Após a aquisição destes dados foi calculado o percentual de inibição do crescimento através da seguinte fórmula:

[0061] $$Porcentagem\ de\ inibição\ (\%) = 100\frac{DO\ Controle\ negativo - DO\ Amostra}{DO\ Controle\ negativo - DO\ Meio\ de\ incubação}$$

[0062] A menor concentração do qual não foi observado crescimento bacteriano foi definida como a concentração inibitória mínima. Os resultados dos testes da concentração inibitória mínima (CIM) confirmaram a atividade antibacteriana dos óleos de *C. flexuosus*, *T. vulgaris* e *O. vulgare* contra as cepas de *S. aureus*.

Exemplo 3: Avaliação dos efeitos sinérgicos entre os OEs

[0063] Para avaliação do efeito sinérgico foram selecionadas cepas de *S. aureus* com grande capacidade formadora de biofilme, portanto, foram utilizadas quatro cepas testadas em triplicata. As quatro cepas testadas foram identificadas como: cepa 285, cepa 311, cepa 330 e cepa 335.

[0064] A sinergia da atividade antimicrobiana dos diferentes OEs associados foi analisada pelo delineamento *simplex-centroid-design* como base para avaliar a interação entre os compostos químicos presentes nos OEs. As concentrações de *O. vulgare*, *T. vulgaris* e *C. flexuosus* e suas misturas foram usadas como fatores e o MIC foi utilizado como variável resposta.

[0065] Para a Cepa 285, estudando a interação entre os três óleos, considerando o MIC com o menor valor possível, o ideal na formulação é utilizar apenas o OE de *O. vulgare*, que apresentou maior bioatividade contra essa cepa, e os OEs de *C. flexuosus* e o *T. vulgaris* não tiveram boa bioatividade contra essa cepa, registrando efeito apenas do OE de *O. vulgare*.

[0066] Para a Cepa 311 e a cepa 330, o ideal na formulação é utilizar a mistura entre os OEs de *O. vulgare* com *C. flexuosus* em uma concentração com mais OE de *O. vulgare* e menos OE de *C. flexuosus*, uma vez que esta mistura apresentou maior bioatividade contra essa cepa, diferentemente da mistura entre os OEs de *C. flexuosus* e o *T. vulgaris* que não tiveram boa bioatividade contra essa cepa.

[0067] Para a cepa 335 o melhor é utilizar apenas o OE de *O. vulgare*, que assim como para a cepa 285, também apresentou maior bioatividade contra essa cepa, diferentemente dos OEs de *C. flexuosus* e o *T. vulgaris* que não tiveram boa bioatividade contra a cepa 335, registrando efeito apenas do OE de *O. vulgare*.

[0068] Se pensarmos em uma única composição que seja efetiva contra as quatros cepas microbianas que são consideradas representativas em relação às bactérias

isoladas da mastite bovina, é sugerido que seja considerado 75% de *O. vulgare* e 25% de *C. flexuosus* na composição para testar a bioatividade.

Exemplo 4: Formulação de um creme contendo óleos essenciais com atividade comprovada contra *Staphylococcus aureus*

[0069] O creme/pomada foi produzido a partir de uma solução compreendendo 6,00 g de alginato de sódio dissolvido em 50 mL de água destilada permanecendo sob agitação crescente usando agitadora orbital de 86 *g* a 302 *g* entre 5 e 10 min. Em seguida 0,5 mg de óleo essencial foi adicionado a base do creme/pomada sob agitação de 302 *g* (10.600 RPM) por 1 a 2 min com o auxílio de um homogeneizador ultra-turrax (NT 138, novatecnica) para total homogeneização do óleo ao creme/pomada. Com este método, foi possível a produção de um creme homogêneo capaz de ser utilizado como um produto farmacêutico contra microrganismos causadores da mastite bovina.

REIVINDICAÇÕES

1. “CREME COM ÓLEOS ESSENCIAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA INIBITÓRIA CONTRA *Staphylococcus aureus*” contendo uma formulação estável na forma de base creme/pomada com composição de água ou tampão, conservante, solvente, agente espessante e agente emoliente **caracterizado por** ter ainda na dita composição, uma mistura sinérgica, com pelo menos dois óleos essenciais tendo comprovada atividade contra microrganismos causadores da mastite compreendendo os ditos óleos essenciais das espécies *Cymbopogon flexuosus*, *Thymus vulgaris, Origanum vulgare, Eucalyptus globulus, Mentha piperita, Syzygium aromaticum* e *Melaleuca alternifolia, Piper nigrum, Attalea speciosa e Syagrus coronata*.

2. “CREME COM ÓLEOS ESSENCIAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA INIBITÓRIA CONTRA *Staphylococcus aureus*”, de acordo com as reivindicações 1, **caracterizado pelos** óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus*, *Thymus vulgaris, Origanum vulgare* serem considerados os melhores, baseados nos exemplos do relatório descritivo, contra a mastite bovina podendo ser incorporados em produtos farmacêuticos.

3. “CREME COM ÓLEOS ESSENCIAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA INIBITÓRIA CONTRA *Staphylococcus aureus*”, de acordo com as reivindicações 1, **caracterizado pelo** creme ser preparado pela adição de alginato de sódio a água sob constante e vigorosa agitação e após isso, ocorrer a adição do óleo essencial.

4. “CREME COM ÓLEOS ESSENCIAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA INIBITÓRIA CONTRA *Staphylococcus aureus*”, de acordo com a reivindicação 1 e 3, **caracterizado pelo** creme poder ser usado no tratamento da mastite bovina.

RESUMO

“CREME COM ÓLEOS ESSENCIAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA INIBITÓRIA CONTRA *Staphylococcus aureus*”

A presente invenção descreve um produto antimicrobiano produzido a partir de óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus, Origanum vulgare e Thymus vulgaris* dentre outros com atividade antimicrobiana comprovada após realização do método de disco-difusão e determinação da concentração inibitória mínima (MIC) pela técnica de microdiluição em caldo contra *Staphylococcus aureus*. Os óleos essenciais poderão ser utilizados em sua forma livre e combinados, estabilizados no formato de creme e/ou pomada. O creme foi produzido através de processo de agitação compreendendo água, agente de viscosidade e óleos essenciais como agentes ativos. Este creme poderá ser utilizado no tratamento e/ou prevenção de infecções causadas pela *S. aureus* como a mastite bovina.

Capítulo 2

Patente a ser depositada no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual - INPI

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS REVESTIDAS DE QUITOSANA CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL COMO ALTERNATIVA ANTIMICROBIANA

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da invenção

[001] O presente pedido de patente de invenção descreve um processo de obtenção de uma nanopartícula revestida por quitosana contendo óleos essenciais com atividade antimicrobiana comprovada contra *Staphylococcus aureus* produzida por um processo de nanoprecipitação sob agitação. A nanopartícula serve como agente encapsulante para incorporação de óleos essenciais a serem utilizados no tratamento e/ou prevenção de infecções causadas por *S. aureus*, pois utiliza matéria prima de fonte natural livre de antibiótico. Esta invenção se situa no campo da biotecnologia com ênfase em nanotecnologia aplicada a saúde humana e veterinária.

Antecedentes da invenção

[002] A nanotecnologia trata-se de toda tecnologia que seja implementada em nanoescala e possua aplicações no mundo real, sendo assim, a nanotecnologia traz uma inovação disruptiva e representa uma megatendência, tida como uma revolução industrial moderna que terá um impacto profundo em nossa sociedade e economia (BHUSHAN. *Springer Handbook of Nanotechnology*., 1: 1–19, 2017). Os avanços da nanotecnologia e nanociência tem resultado em incontáveis possibilidades de aplicações de nanomateriais uma vez que as características químicas e físicas únicas dos nanomateriais podem ser exploradas para aplicações comerciais e para novos feitos que beneficiem a sociedade, onde muitos desses feitos já migraram de bancadas de laboratório para sites de comércio eletrônico e prateleiras de lojas (VANCE et al., *Beilstein J. Nanotechnol*., 6: 1769–1780, 2015; BHUSHAN. *Springer Handbook of Nanotechnology*., 1: 1–19, 2017).

[003] Os nanomateriais compreendem as nanopartículas, fios quânticos, nanotubos e nanofios, mas são as nanopartículas as mais estudadas e conhecidas (BHUSHAN.*Springer Handbook of Nanotechnology.*, 1: 1–19, 2017; GARZÓN, *Repert Med Cir*., 27(2):75-80, 2018). No campo da nanotecnologia, as nanopartículas (NPs) são muito utilizadas como transportadoras farmacêutica, na fabricação de biossensores, na análise biomédica entre outros (OTI, *Curr. Drug Discov. Technol.,*17(4): 448-456, 2020; GARCIA et al., *Braz. J. Dev.*, 7(3): 31130-31145, 2021). Suas principais características estão ligadas ao fato de serem biocompatíveis e biodegradáveis; em geral as NPs são desenvolvidas a partir de polímeros naturais, sintéticos ou semissintéticos, e comumente apresentam-se em formato de nanoesferas e nanocápsulas, variando de 10 a 1000 nm de diâmetro. As nanocápsulas são vesículas formadas por um envoltório polimérico organizado em torno de um núcleo, e as nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica (BIZERRA E SILVA, *Rev. Saúde Meio Ambiente*., 3(2): 1-12, 2016; MELO et al. *Res. Soc. Dev.,* 9 (7), 2020).

[004] Outro ponto importante é que as nanopartículas como nanocápsulas e nanoesferas, podem apresentar características de Sistemas de Liberação Controlada (SLC) (JAIN E THAREJA, *Artif Cells Nanomed Biotechnol.,* 47(1): 524–539, 2019) para os mais diversos tipos de compostos químicos. As nanopartículas podem ser desenvolvidas com principal objetivo de maior controle da liberação do princípio ativo e dos níveis do fármaco no sítio de ação desejado, além disso podem apresentar muitas vantagens em comparação com os métodos de dosagens convencionais, também pode melhorar a eficácia do fármaco e reduzir os efeitos colaterais (BIZERRA E SILVA, *Rev. Saúde Meio Ambiente*., 3(2): 1-12, 2016).

[005] Uma molécula bastante utilizada como material de revestimento em nanopartículas é a quitosana (CH), um polissacarídeo alcalino natural e renovável, obtido a partir da desacetilação da quitina, extraída de alguns crustáceos e fungos (WANG et al. *Int. J. Mol. Sci.,* 21: 487, 2020; SÁNCHEZ-MACHADO et al. *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, 2019). A CH e seus derivados são uma fonte eficiente, favorável e segura na produção de nanopartículas, e é um dos biopolímeros de carboidrato biodegradável e biocompatível mais importantes na ciência farmacêutica, por apresentar muitos benefícios, principalmente na segurança e aumento da eficácia dos produtos farmacêuticos (MATICA et al. *Int. J. Mol. Sci.,* 20: 5889, 2019; ABDEL-HACK et al. *Int. J. Biol. Macromol*., 164: 2726–2744, 2020; SHARIATINIA. *Adv. Colloid*

Interface Sci., 263: 131-194, 2019). Ainda, a CH apresenta capacidade de encapsular compostos químicos hidrofóbicos e hidrofílicos, maior biodisponibilidade e impacto do fármaco no órgão alvo, e também uma maior estabilidade terapêutica contra degradação química e enzimática, além disso apresenta propriedades analgésica, filmógena, antimicrobiana, antiiflamatória, hemostática e mucoadesiva (MATICA et al. *Int. J. Mol. Sci.,* 20: 5889, 2019; ABDEL-HACK et al. *Int. J. Biol. Macromol*., 164: 2726–2744, 2020; SHARIATINIA., *Adv. Colloid Interface Sci..,* 263: 131-194, 2019).

[006] Dentre os compostos químicos que podem ser encapsulados pela quitosana, destacamos os óleos essenciais (OEs), que são compostos aromáticos voláteis extraídos especialmente de cascas, sementes, flores, folhas e rizomas de plantas aromáticas, e são frequentemente utilizados na aromaterapia (ZHANG E YAO., *J. Agric. Food Chem,* 2019). Há séculos, os OEs de plantas medicinais tem sido muito usados para tratar doenças devido aos seus efeitos antimicrobianos e por apresentarem propriedades antiparasitária, antifúngica, antiviral, antibiofilme, anticâncer, antioxidante, antibacteriano entre outros diversos efeitos (ADUKWU et al, *Appl Microbiol Biotechnol,* 2016; GALOVICOVÁ et al., *Plants*., 10: 1959, 2021). As aplicações e uso comercial desses compostos tem crescido consideravelmente, onde os OEs são muito utilizados no manejo de infecções em animais. Porém, a bioatividade e toxicidade dos OEs ainda é pouco conhecida (ADUKWU et al, *Appl Microbiol Biotechnol,* 2016).

[007] No momento presente, há uma tendência de crescimento da resistência de muitos microrganismos aos antibióticos, sendo indispensável buscar compostos alternativos para um equilíbrio da microbiota (GALOVICOVÁ et al., *Plants*., 10: 1959, 2021). Os OEs podem servir de matriz de encapsulação para a produção de nanopartículas e, o desenvolvimento de nanopartículas contendo estes compostos naturais pode ter potencial para a substituição de antibióticos tradicionais (GALOVICOVÁ et al., *Plants*., 10: 1959, 2021). Portanto, em uma nanopartícula de OE revestida com quitosana, o princípio ativo pode ser liberado de forma gradativa, desta forma seria possível reduzir o número de aplicações e, consequentemente, os efeitos colaterais e a toxicidade (BATISTA, PEPE, *Cien. Saude. Colet.*, 19(7):2105-2114, 2014). Além disso, o uso de diferentes OEs juntos pode potencializar o efeito antimicrobiano de ambos, conhecido como efeito sinérgico, e desta forma, pode reduzir ou substituir o uso de antibióticos no tratamento de infecções causadas por microrganismos, como exemplo, a mastite bovina.

[008] A mastite bovina é caracterizada por uma inflamação no tecido do úbere manifestando modificações patológicas como dor, inchaço, edema e fibrose, e que consequentemente afeta a produção do leite (SHAHEEN et al., *J Adv Dairy Res.*, 4:1, 2016). Considera-se que a MB seja uma das patologias mais importante e predominante em gado leiteiros, causando consideráveis consequências para o bem-estar e a saúde animal, além de apresentar elevados custos econômicos para os produtores de leite (ANGELOUPOULO et al., *Crit. Rev. Microbiol.,*1-17, 2019). Embora a redução na produção de leite seja uma parcela importante nas perdas econômicas motivada pela mastite, os prejuízos ocasionados por esta doença ainda incluem os custos de diagnóstico microbiológico, medicamentos, mão de obra, queda na produção e na qualidade do leite, além do descarte do leite e até mesmo abate do animal, nos casos mais graves (HEIKKILA et al., *J. Dairy Sci.,* 101:1–12, 2018; SILVA et al., *Pesqui Vet Bras.*, 38(2): 223-228, 2018). O principal agente causador da MB é o *Staphylococcus aureus*, bactéria contagiosa que naturalmente se espalha através de roupas de cama de gado contaminadas, maquinários, mãos, entre outros (HOQUE et al., *Int. J. Vet. Sci.*, 6(1): 53-60, 2018; ANGELOPOULOU et al., *Crit. Rev. Microbiol.,*1-17, 2019).

[009] Embora a antibioticoterapia seja a principal forma de lidar com a mastite bovina, seu uso é limitado e nem sempre efetivo, pois, além dos gastos com a sua utilização, tem-se observado a presença de resíduos de antibióticos no leite e no meio ambiente tornando-o uma ameaça potencial à saúde humana e animal (SILVA et al., *Pesqui Vet Bras., 38(2): 223–228,* 2018; LOPES et al., *Res. Vet. Sci.*, 131: 186–193, 2020). Portanto, produtos e tratamentos alternativos que proponham a prevenção, redução ou não utilização de antibióticos para tratar mastite bovina podem ser a solução ideal para esta doença.

[0010] Diante do exposto, a presente invenção propõe um processo de produção de nanopartículas poliméricas revestidas de quitosana contendo óleo essencial como alternativa antimicrobiana utilizável no tratamento para infecções causadas por *S. aureus*.

[0011] Embora existam documentos na literatura patentária que proponham o processo de produção de nanopartículas poliméricas revestidas de quitosana contendo óleo essencial aplicados a infecções causadas por *S. aureus*, não há conflitos entre o atual pedido e outros encontrados na literatura. Contudo, é importante salientar as diferenças entre o presente documento e encontrado no estado da técnica.

[0012] O documento CN201911366204-6 refere-se ao processo de produção de uma nanoesfera composta por um ou mais medicamentos hidrofóbicos da classe das camptotecina e óxido de grafeno modificado com quitosana como uma camada; onde o método de preparação compreende as seguintes etapas: embeber um fármaco em um líquido de dispersão de óxido de grafeno e realizar tratamento ultrassônico e liofilização para formar nanopartículas. As nanoesferas preparadas pela invenção podem revestir uma pluralidade de compostos químicos hidrofóbicos ou óleos essenciais de plantas voláteis. O documento difere da presente invenção quanto a composição por utilizar óxido de grafeno e fármacos da classe das camptotecina. Também difere em sua composição por não prever a utilização dos óleos essenciais descritos no relatório descritivo, nem nanopartícula como alternativa antimicrobiana contra *S. aureus*.

[0013] O documento CN102504351 refere-se a um filme conservante composto de quitosana usado como principal componente e um processo de preparação do mesmo, o filme apresenta vantagens de ser bom em extensibilidade, flexibilidade, transparência, coeficiente de permeação de oxigênio e permeabilidade à humidade e semelhantes com boa biocompatibilidade com organismos; resistência a degradação enzimática, oxidativa e ácida; e, tem os produtos finais de degradação oligômeros, tais como glucanos diméricos e triméricos. O documento difere da presente invenção por composição e método, pois não prevê a utilização da quitosana como agente de encapsulação para óleos essenciais com comprovada atividade antimicrobiana contra *S. aureus*.

[0014] O documento WO2007149868 descreve a formulação de uma nanopartícula sendo um sistema de liberação controlada, com atividade antimicrobiana conta as bactérias *Staphylococcus aureus, Bacillus circulans, Bacillus cereus, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Propionibacterium acnes, Salmonella enterica, Vibrio anguillarum, Klebsiella pneumoniae, Pfiesteria. piscicida, Pseudomonas aeruginos, Agrobacterium tumefaciens, Erwinia chrysanthemi, Xanthomonas campestris, Coniella diplodiella e Physalospora piricola*, compreendendo alginato e quitosana, pelo menos 50% desacetilada, agente biologicamente ativo selecionado do grupo que consiste em bicarbonato de sódio, peróxido de benzoíla, retinóides, retin A e clindamicina. Embora o documento proponha a produção de uma nanopartícula revestida por quitosana como produto antimicrobiano, este difere da presente invenção em método de produção da nanopartícula e composição, por não relatar o uso e combinação dos óleos essenciais

descritos na presente invenção com comprovada atividade antimicrobiana contra *S. aureus*.

[0015] O documento WO2020225255 refere-se à invenção de um bioconjugado ativo de longa duração compreendendo um derivado de quitosana acoplado a peptídeos antimicrobianos (AMPs) de acordo com a fórmula C - S - L - Cys – AMP, em que o C representa um derivado de quitosana selecionado do grupo que consiste em O-carboximetilquitosana (CMC), 0-carboximetil-N,N,N-trimetilquitosana (TMC), N-(4-N,N-dimetilamino cinamil) quitosana (DMCMC) ou cloreto de N-(4-piridilmetil)quitosano metilado (MPyMeC); S é um espaçador que consiste em uma cadeia de carbono alifática C1-C12 terminada com um grupo amino em ambas as extremidades; L é um reticulante sulfo selecionado do grupo que consiste em: ácido 4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxílico 3-sulfo-N-hidroxisuccinimida (sulfo-SMCC) e outros, Cys é cisteína; e AMP é um peptídeo ou um dendrímero de peptídeo com atividade antimicrobiana. O bioconjugado é adequado para o tratamento ou prevenção de infecções microbianas, feridas infectadas, abscesso, infecções de tecidos moles, infecções diabéticas, osteomielite, infecções de queimaduras, infecções de feridas pós-cirúrgicas, infecções associadas a biomateriais, como tubos endotraqueais, válvulas cardíacas artificiais, cateteres urinários, cateteres venosos centrais, próteses, dispositivos ortopédicos, lentes de contato, dentaduras, próteses articulações e outras infecções associadas à superfície do implante. O documento difere da presente invenção em composição, quanto ao tipo de quitosona usado, tipos de óleo essencial e o método de nanoprecipitação.

[0016] O documento WO2020149756 refere-se a um nanocompósito à base de quitosana como um biocida, agente antimicrobiano e inibidor de corrosão compreendendo em sua formulação quitosana e pelo menos um componente do grupo que consiste em lignina, como o lignossulfonato (Ln), ácido lignossulfônico (LS), lignina de madeira moída, lignina de enzima de madeira moída, lignocelulose entre outros. Além disso, a formulação pode ser usada contra uma variedade de microrganismos, incluindo fungos, algas, bactérias redutoras de sulfato (SRB) e outras bactérias. O nanocompósito pode ser utilizado no tratamento de água e na redução da corrosão induzida por microrganismo. Seu uso também pode incluir revestimentos antimicrobianos, desinfecção da água, adsorvente, remoção de poluentes da água, tratamento de águas residuais, desinfecção da água do mar, embalagem de alimentos, remoção de corantes, administração de medicamentos, curativo, antifúngico, remoção de ácido, bactérias

redutoras de sulfato, bactérias produtoras de ácido, bactérias redutoras de ferro e outras. O documento difere da presente invenção em composição e método por não apresentar OEs em sua composição e por não se tratar da formulação de uma nanopartícula contendo quitosana como agente encapsulante contra infecções intramamárias em bovinos causada por *S. aureus*.

[0017] O documento US20190281845 refere-se a um processo de preparação de filmes comestíveis bioativos constituídos por quitosana de alto peso molecular ou uma mistura de quitosana de alto peso molecular e um extrato aquoso de proteína de quinoa , extraído em pH 11, cujo objetivo é aumentar a vida útil de frutas de baixo pH, mantendo-as frescas, uma vez que a incorporação de nanopartículas de quitosana e timol em sua composição possibilita a permeabilidade ao vapor de água de materiais hidrofílicos, e proporciona uma maior barreira a microrganismos decompositores. A atividade antimicrobiana do filme foi avaliada contra *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomona aeureginosa, Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium, Enterobacter aerogenes* e *Botrytis cinerea*. O documento difere da presenta invenção em composição e método por não apresentar em sua formulação OEs nanoencapsulados por quitosana.

[0018] O documento US8927024B1A descreve composições e métodos contendo copolímeros de anidrido sebácico (SA) e anidrido de 1,6-bis-(p-carboxifenoxi) hexano (CPH), copolímeros de 1,8-bis(carboxifenoxi)-3,6 anidridos de -dioxaoctano (CPTEG) e anidrido de 1,6-bis-(p-carboxifenoxi)hexano (CPH), ou várias combinações dos mesmos para tratar infecções microbianas em animais, para inibir a replicação de micróbios em células infectadas e para matar patógenos em células infectadas. Os métodos podem incluir a administração em um animal que necessite de tal tratamento e a composição compreende micropartículas ou nanopartículas de polianidrido que encapsulam uma pluralidade de agentes antimicrobianos. As micropartículas ou nanopartículas podem se acumular em monócitos infectados, células dendríticas, ambos, ou em outras células infectadas, e degradar por erosão superficial durante um período de tempo para liberar o agente antimicrobiano, matando ou inibindo assim os micróbios e tratando a infecção. O documento difere da presente invenção em composição e método por não apresentar em sua formulação OEs nanoencapsulados por nanoprecipitação em quitosana.

[0019] O documento CN113368037 descreve um hidrogel sensível à temperatura de quitosana carregada com nanopartículas de lactoferrina bovina, e um método de preparação e aplicação do mesmo em que um pó liofilizado de nanopartículas de

quitosana carregadas com peptídeo de lactoferrina bovina é misturado em uma solução de quitosana de peso molecular médio e uma solução aquosa de glicerofosfato de beta-sódio para obter o hidrogel sensível à temperatura. As nanopartículas de peptídeo de lactoferrina preparadas pelo método possuem propriedade gelificante sensível à temperatura, degradabilidade, biocompatibilidade e atividade bacteriostática *in vitro*, e o material compósito pode fornecer uma nova opção de preparação para o tratamento clínico da mastite bacteriana bovina. O documento difere da presente invenção em composição e método por não apresentar em sua formulação OEs nanoencapsulados por nanoprecipitação em quitosana.

[0020] O documento WO2011150481A1 descreve o desenvolvimento de dois tipos de nanocápsulas poliméricas para encapsular a cloxacilina benzatina, um medicamento antimicrobiano. A invenção refere-se a uma nova forma de tratamento para mastite em gado leiteiro, onde duas formulações de nanocápsulas foram desenvolvidas podendo ser utilizadas para encapsular diversos fármacos, além da cloxacilina e benzatina, proporcionando uma nova terapia para mastite em vacas, com o objetivo de evitar o uso de altas doses de medicamentos utilizados em formulações convencionais, contribuindo assim para a melhoria da qualidade do leite. O documento difere da presente invenção em composição e método por não apresentar OEs em sua composição e por não se tratar da formulação de uma nanopartícula contendo quitosana como agente encapsulante contra infecções intramamárias em bovinos causada por *S. aureus*.

[0021] O documento CA3057856A1 descreve compósitos poliméricos sol-gel com quitosana, um polímero hidrofílico, um polissiloxano e um agente de gelificação em um meio adequado. O compósito de polímero sol-gel pode formar uma vedação durável ou sólido forte em resposta a um ou mais estímulos fisiológicos e tem como objetivo reduzir ou prevenir a incidência de um distúrbio mamário em um animal leiteiro, em que o compósito de polímero sol-gel pode criar uma barreira física na superfície do teto ou no canal do teto de um animal não humano para tratamento profilático de distúrbios mamários, tais como mastite. O documento difere da presente invenção em termos de composição e por não se tratar de uma nanopartículas revestida por quitosana contendo os óleos essências em sua composição.

[0022] O documento US20190117799A1 descreve o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas sólidas responsivas a estímulos que podem ser usadas como agentes terapêuticos e de diagnóstico, incluindo a encapsulação de fármacos quimioterapêuticos,

proteínas, ácidos nucleicos ou outras moléculas pequenas. As nanopartículas podem ser formadas por emulsão com um solvente não aquoso, extração de solvente ou nanoprecipitação de polímeros em combinação com polímeros responsivos a estímulos, apresentam diâmetro com cerca de 50 a 500 nm, possuem uma camada externa hidrofílica e um núcleo interno hidrofóbico que lhes dá alta estabilidade e capacidade de carregar agentes terapêuticos com alta eficiência de encapsulamento. As nanopartículas podem ser feitas de forma que o fármaco seja liberado principalmente dentro de certos órgãos, tecidos ou células do corpo alvo, após exposição a estímulos endógenos ou exógenos, e sua taxa de liberação pode ser controlada podendo ser realizada por explosão, sustentada, atrasada, ou uma combinação dos mesmos. O documento difere da presente invenção por não ser uma nanopartícula de óleos essenciais revestida de quitosana, produzido pelo método de nanoprecipitação.

[0023] O documento KR101722794B1 descreve nanopartículas, incluindo nanoglobulinas, e micropartículas, incluindo microesferas, com diâmetro de 1 nm a cerca de 10.000 nm, formadas a partir de uma variedade de materiais como os polímeros sintéticos, polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, moléculas pequenas e suas combinações, com o objetivo de serem usadas em diferentes aplicações como diagnóstico, separação e entrega de fármacos. O documento também se refere a um método para aumentar a absorção celular de um agente ativo, podendo ser do grupo que consiste em analgésicos, anestésicos, estimulantes, agentes adrenérgicos, agentes antiinflamatórios, antibióticos, antioxidantes entre outros. O documento difere da presente invenção por não se tratar de uma nanopartícula contendo quitosana como agente encapsulante para óleos essenciais para o tratamento da mastite em animais leiteiros.

Descrição da Invenção

[0024] Para fins desta invenção foram utilizados óleos essenciais de *Cymbopogon flexuosus* conhecida como capim-limão indiano nativo da Ásia, *Thymus vulgaris* conhecida como tomilho nativo da região do mediterrâneo e *Origanum vulgare* conhecido como orégano originado da região do mediterrâneo e Índia. Estas plantas não fazem parte do patrimônio genético nacional. Os OEs destas plantas podem apresentar atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novos tratamentos contra muitos tipos de infecção causadas por esse microrganismo.

[0025] Para fins desta invenção, a quitosana de 0,1 a 1% (p/v) de baixo peso molecular poli(D-glucosamina) foi usada como material de revestimento das nanopartículas, uma vez que tem sido bastante utilizada como polímero formador de partículas e como material de revestimento de superfície, além disso, nanocarreadores revestidos por quitosana podem apresentar diversas vantagens como controlar a liberação do fármaco, aumentar os efeitos antimicrobianos, melhorar a estabilidade físico-química, melhorar a biodisponibilidade e eficácia do fármaco, promover a mucoadesividade e penetração tecidual e modular as interações celulares (FRANK et al., *React. Funct. Polym*., 147, 2020).

[0026] Para fins desta invenção, o ácido acético comumente aplicado para solubilizar a quitosana foi utilizado preferencialmente, uma vez que a quitosana ativa suas propriedades antimicrobianas se dissolvida em solução ácida (MIRA et al., *J Conserv Dent*., 20(5): 297–301, 2017; GOÑI et al., *J Food Sci Technol*., 54(3): 620-626, 2017).

[0027] Devido a quitosana apresentar maior atividade antibacteriana e melhor solubilidade e capacidade para formar géis em pH ácido, a água da formulação teve seu pH ajustado num intervalo entre 4,5 e 6,0 com a adição de um ácido, como o ácido cítrico ou lático, um tampão como o tampão citrato, fosfato de sódio, tris, citrato-fosfato, acetato de sódio e glicina-HCl (CHANG et al., *Carbohydr. Polym*., 134: 74-81, 2015; CARVALHO et al., *Rev. Virtual Quim*., 10(2): 211-228, 2018).

[0028] Para fins desta invenção foram utilizados o polisorbato 80 (Tween 80) compreendendo 1 a 5% (p/p) e o monooleato de sorbitano 80 (Span 80) compreendo 1 a 3% (p/p), ambos tipos de tensoativos bastante utilizados na indústria farmacêutica e alimentícia devido à baixa toxicidade, como agentes tensoativos na preparação das nanopartículas (KOPANICHUK et al., *J. Phys. Chem*., 122: 8047−8055, 2018).

[0029] As nanopartículas foram preparadas a partir de duas fases descritas a seguir, de acordo com a Tabela 1. Fase aquosa compreendendo uma solução de quitosana diluída previamente em ácido acético glacial sob agitação, sendo esta diluída posteriormente em 0,1% (p/v) em água acidificada ou tampão citrato o que corresponde 90 a 95% (p/p) da formulação da nanopartícula com posterior evaporação do ácido acético. Depois foi adicionado a dita fase aquosa polisorbato 80 (Tween 80) de 1 a 5% (p/p) sendo esta dispersão submetida a suave agitação mecânica para que não ocorra formação de bolhas.

[0030] Fase oleosa compreendendo óleo essencial de capim-limão, tomilho e orégano preferencialmente 0,1 a 2% (p/p) e monooleato de sorbitano 80 (Span 80) de 1 a 3% (p/p) da formulação da nanopartícula, submetida a suave agitação. Após isso, foi usado o método de nanoprecipitação onde a fase oleosa foi vertida na fase aquosa sob suave agitação para a formação das nanopartículas compreendendo períodos de tempo perto de 24 horas.

[0031] Tabela 1. Composição das fases aquosas e oleosas das nanopartículas.

Descrição	Fase	Porcentagem (p/p)
Solução de quitosana diluída em ácido acético glacial, sendo esta diluída posteriormente em 0,1% (p/v) de tampão citrato.	Aquosa	90 a 95%
Polisorbato 80 (Tween 80)	Aquosa	1 a 5%
Óleo essencial compreendendo capim-limão, tomilho e orégano	Oleosa	0,1 a 2%
Monooleato de sorbitano 80 (Span 80)	Oleosa	1 a 3%
Total		100%

[0032] Na presente invenção as nanopartículas podem ser incorporadas em uma base creme/pomada comercial contendo água ou tampão como solventes, conservantes, agentes de viscosidade, agentes espessantes e agentes emolientes comumente utilizados na farmacologia na preparação de pomadas para aplicação no tratamento de infecções causadas por *S. aureus,* como exemplo, a mastite bovina, uma vez que os óleos essenciais de *O. vulgare*, *C. flexuosus* e *T. vulgaris* utilizados como agentes ativos, apresentam atividade antimicrobiana comprovada contra *S. aureus* (SILVA et al., patente a ser depositada).

[0033] As nanopartículas foram caracterizadas conforme descrito nos exemplos a seguir.

Exemplo 1: Produção de nanopartículas revestidas por quitosana contendo óleos essenciais

[0034] Inicialmente, foi produzida uma solução de quitosana em ácido acético deixada por 10 min de agitação a 302 *g*. Após isso, a quitosana foi diluída para se obter 0,1 mg/mL em tampão citrato pH 5,0 e 0,1 M, onde permaneceu por 24 h para a evaporação total do ácido acético e total solubilidade da quitosana.

[0035] As nanopartículas foram produzidas a partir de duas fases sendo i. Fase aquosa contendo 9,500 g de solução de quitosana conforme descrito acima e 0,300 g de polisorbato 80; ii. Fase oleosa contendo 0,200 g de óleo essencial e 0,100 g de monooleato de sorbitano 80. Ambas as fases ficaram sob agitação crescente de 34 *g* até 302 *g* em agitação orbital por 15 min a 25 °C para evitar a formação de bolhas devido à presença dos surfactantes.

[0036] Para a preparação das nanopartículas pelo método de nanoprecipitação, a fase oleosa foi vertida na fase aquosa por gotejamento permanecendo sob agitação constante e vigorosa de 302 *g* por 24 h para a completa homogeneização. Foram preparados três tipos de nanopartículas a partir dos óleos essenciais de capim-limão, tomilho e orégano.

Exemplo 2: Efeito da concentração dos surfactantes sob a preparação das nanopartículas.

[0037] Para a determinação da proporção final de surfactantes na preparação das nanopartículas foram utilizadas proporções variáveis de tampão citrato contendo 0,1% de quitosana, tween 80 e span 80 de acordo com a Tabela 2. Após 24 h, estas nanopartículas foram avaliadas nos exemplos a seguir.

[0038] Tabela 2. Diferentes proporções dos surfactantes utilizados na preparação das nanopartículas. Siglas: O1 - Orégano 1, O2 - Orégano 2, O3 - Orégano 3, T1 - Tomilho 1, T2 - Tomilho 2, T3 - Tomilho 3, C1 - Capim-limão 1, C2 - Capim-limão 2, C3 - Capim-limão 3, OEs - Óleos essenciais, Tween 80 - Polisorbato 80, Span 80 - Monooleato de Sorbitano.

Amostra	Solução 0,1 mg/mL de quitosana	OEs	Tween 80	Span 80
O1	9,3 g (93% p/p)	0,2 g (2% p/p)	0,5 g (5% p/p)	0,25 g (2,5% p/p)
C1	9,3 g (93% p/p)	0,2 g (2% p/p)	0,5 g (5% p/p)	0,25 g (2,5% p/p)
T1	9,3 g (93% p/p)	0,2 g (2% p/p)	0,5 g (5% p/p)	0,25 g (2,5% p/p)
O2	9,4 g (94% p/p)	0,2 g (2% p/p)	0,4 g (4% p/p)	0,15 g (1,5% p/p)

C2	9,4 g (94% p/p)	0,2 g (2% p/p)	0,4 g (4% p/p)	0,15 g (1,5% p/p)
T2	9,4 g (94% p/p)	0,2 g (2% p/p)	0,4 g (4% p/p)	0,15 g (1,5% p/p)
O3	9,5 g (95% p/p)	0,2 g (2% p/p)	0,3 g (3% p/p)	0,10 g (1% p/p)
C3	9,5 g (95% p/p)	0,2 g (2% p/p)	0,3 g (3% p/p)	0,10 g (1% p/p)
T3	9,5 g (95% p/p)	0,2 g (2% p/p)	0,3 g (3% p/p)	0,10 g (1% p/p)

Exemplo 3: Avaliação das características organolépticas das nanopartículas

[0039] As nanopartículas foram observadas e comparadas após 0 e 24 h de sua preparação e suas características organolépticas foram avaliadas seguindo os protocolos da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1 vol., 1 ed., 52 p., Brasília, 2004). No critério cor, as amostras foram classificadas como normal (sem alteração), levemente modificada, modificada ou intensamente modificada. No critério aspecto, as nanopartículas foram classificadas como i. opaca, semi-opaca ou translúcidas; ii. homogênea ou heterogênea; iii. fluída, levemente viscosa ou viscosa. E no critério odor, as amostras foram classificadas como normal (sem alteração), levemente modificado, modificado ou intensamente modificado. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

[0040] Tabela 3. Aspectos organolépticos decorrentes das diferentes proporções dos surfactantes utilizados na preparação das nanopartículas. Siglas: O1 - Orégano 1, O2 - Orégano 2, O3 - Orégano 3, T1 - Tomilho 1, T2 - Tomilho 2, T3 - Tomilho 3, C1 - Capim-limão 1, C2 - Capim-limão 2, C3 - Capim-limão 3.

Amostra	Aspecto	Cor	Odor
O1	Homogênea / Opaca / Fluída	Sem alteração	Sem alteração
C1	Homogênea / Semi-opaca / Fluída	Sem alteração	Sem alteração
T1	Homogênea / Translúcida / Fluída	Sem alteração	Sem alteração

O2	Homogênea / Opaca / Fluída	Sem alteração	Sem alteração
C2	Homogênea / Semi-opaca / Fluída	Sem alteração	Sem alteração
T2	Homogênea / Translúcida / Fluída	Sem alteração	Sem alteração
O3	Homogênea / Opaca / Fluída	Sem alteração	Sem alteração
C3	Homogênea / Semi-opaca / Fluída	Sem alteração	Sem alteração
T3	Homogênea / Semi-opaca / Fluída	Sem alteração	Sem alteração

Exemplo 4: Determinação da estabilidade

[0041] Para a determinação da estabilidade das nanopartículas, as amostras foram submetidas a centrifugação por 1210 *g* por 30 min, conforme estabelecido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1 vol., 1 ed., 52 p., Brasília, 2004). Depois disto, as nanopartículas se mantiveram estáveis sem separação de fases.

Exemplo 5: Análise das características físico-químicas das nanopartículas

[0042] Para a avaliação do tamanho médio, índice de Polidispersão (PDI) e Potencial Zeta (ζ - mv) das nanopartículas produzidas, análises com o auxílio de um zetasizer Nano ZS (Marvern) foram realizadas por 3 repetições no qual seus resultados são apresentados na Tabela 4.

[0043] Tabela 4. Análise das características físico-químicas das nanoemulsões. Siglas: O1 - Orégano 1, O2 - Orégano 2, O3 - Orégano 3, T1 - Tomilho 1, T2 - Tomilho 2, T3 - Tomilho 3, C1 - Capim-limão 1, C2 - Capim-limão 2, C3 - Capim-limão 3, PDI - Índice de Polidispersão, ζ - Potencial Zeta.

Amostra	Tamanho (nm)	PDI	ζ (mv)
O1	215,80 ± 2,50	0,10	- 1,48 ± 0,07
C1	43,60 ± 1,20	0,19	6,82 ± 0,37
T1	140,30 ± 2,50	0,23	- 0,41 ± 0,13

O2	193,80 ± 2,80	0,09	- 1,13 ± 0,14
C2	54,27 ± 1,30	0,18	6, 47 ± 0,46
T2	151,80 ± 5,60	0,18	0,43 ± 0,08
O3	167,80 ± 4,50	0,10	- 0,52 ± 0,17
C3	67,32 ± 0,60	0,17	5, 04 ± 0,57
T3	139,20 ± 2,20	0,19	- 0,29 ± 0,35

[0044] Como observa-se na Tabela 4. As partículas aqui produzidas se caracterizaram como nanopartículas, visto que o tamanho de suas partículas variou aproximadamente de 43 a 220 nm. Foi avaliado o índice de polidispersão (PDI), outra medida importante, que descreve a quão homogênea em tamanho as partículas são. Os valores de PDI podem variar de 0 a 1, em que partículas com PDI inferiores a 0,100 apresentam-se como monodispersas, já as partículas com PDI acima de 0,100 apresentam-se como polidispersas (RAVAL et al., *Basic Fundamentals of Drug Delivery,* 369-400, 2019). Como observa-se os valores de PDI encontrados nas nanopartículas variaram de 0,080 a 0,200, o que indica boa dispersão das partículas.

[0045] Outro parâmetro avaliado foi o potencial zeta (ζ - mv), que é um índice da magnitude de interação das forças de repulsão entre as partículas, e é usado para avaliar a estabilidade de uma dispersão (MODENA et al., *Adv. mater,* 31:32, 2019). Nos resultados apresentados na Tabela 4 foi possível observar que os valores encontrados ficaram entre -1,48 mV a 6,47mV. Embora a formulação dessas nanopartículas tenha expressado resultados adequados para uma formulação tecnológica em relação aos parâmetros observados, é sugerido que as nanopartículas C1, C2, e C3 sejam usadas, por apresentarem potencial zeta com carga positiva*,* uma vez que em trabalho realizado por Esteban et al., (*Colloids Surf. B*., 139: 87-94, 2016) mostrou que o potencial zeta de diferentes cepas de *S. aureus* apresentou-se com carga negativa – 29,7 mV. Sendo assim, as amostras de nanopartículas com carga positiva podem ter atração eletrostática por *S. aureus*, o que poderia aumentar o seu potencial antimicrobiano.

Exemplo 5: Efeito antimicrobiano das nanopartículas contra cepas causadoras da mastite bovina isoladas da bacia leiteira do estado de Pernambuco

[0046] Seguindo a norma do Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (BRCAST, 2021), as nanopartículas poliméricas revestidas de quitosana contendo os OEs de *C. flexuosus*, *T. vulgaris* e *O. vulgare* passaram por testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra as cepas de *S. aureus.*

[0047] Foram utilizadas placas de 96 poços com fundo “U”, onde as nanopartículas foram diluídas em Mueller Hinton caldo, distribuídas e testadas a partir de uma diluição seriada em concentrações decrescentes de 20,000, 10,000, 5,000, 2,500, 1,250 e 0,625 mg/mL, além de duas fileiras para o controle positivo e controle negativo. Todos os testes com as nanopartículas foram realizados em triplicata.

[0048] Após a diluição seriada das nanopartículas nas placas de 96 poços, foram depositados 10 µL de suspensão bacteriana (em salina) padronizada com a escala 0,5 de McFarland (1,5 x 10^8 UFC/mL) em cada poço, em seguida as placas de 96 poços foram incubadas por 24 horas em estufa bacteriológica a 37 ± 1 °C, e posteriormente submetidas a leitura espectrofotométrica em um comprimento de onda de 540 nm, para obtenção dos dados, que permitiram que o percentual de inibição do crescimento fosse calculado através da seguinte fórmula:

[0049] $$Porcentagem\ de\ inibição\ (\%) = 100\frac{DO\ Controle\ negativo - DO\ Amostra}{DO\ Controle\ negativo - DO\ Meio\ de\ incubação}$$

[0050] A partir desses dados, a Concentração Inibitória Mínima foi estabelecida como a concentração mais baixa cujo crescimento bacteriano não foi observado. Sendo assim, os testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) realizados com as nanopartículas poliméricas de quitosana confirmaram a atividade antibacteriana contra as cepas de *S. aureus* no qual seus resultados são apresentados na Tabela 5.

[0051] Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e percentual de inibição das Nanopartículas revestidas de quitosana contendo óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon flexuosus* e *Origanum vulgare* contra cepas de *Staphylococcus aureus*. As quatros cepas de *S. aureus* testadas foram identificadas como: Cepa 285, Cepa 311, Cepa 330 e Cepa 335.

Tipo de Nanopartícula / Antibióticos	Cepa e Inibição (%)	CIM (Concentração do óleo utilizado na produção da nanopartícula) (mg/mL)

Nanopartícula de Tomilho	285	311	330	335	1,250
	83%	79%	56%	61%	
Nanopartícula de Capim-limão	285	311	330	335	2,500
	76%	75%	63%	80%	
Nanopartícula de Orégano	285	311	330	335	0,156
	84%	91%	74%	89%	

[0052] A concentração inibitória mínima ideal, resultante dos testes realizados com óleo de tomilho puro contra as cepas de *Staphylococcus aureus* foi 10,000 mg/mL, mas os resultados obtidos com as nanopartículas de tomilho demonstrou ser oito vezes melhor que o óleo de tomilho puro com a CIM ideal de 1,250 mg/mL.

[0053] Nos testes realizados com óleo capim-limão puro os resultados indicaram que a de concentração inibitória mínima do óleo de orégano contra as cepas de *S. aureus* foi 5,000 mg/mL, mas as nanopartícula de capim-limão apresentaram resultado duas vezes melhor que o óleo puro com o CIM de 2,500 mg/mL.

[0054] E nos testes realizados com o óleo de orégano puro contra as cepas de *S. aureus*, foi observado que a concentração inibitória mínima apresentada pelo óleo foi de 1,250 mg/mL, mas os resultados obtidos com as nanopartículas de orégano apresentaram resultado oito vezes melhor que o óleo puro com o CIM de 0,156 mg/mL.

REIVINDICAÇÕES

1. “PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS REVESTIDAS DE QUITOSANA CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL COMO ALTERNATIVA ANTIMICROBIANA” **caracterizado por** um processo de produção de uma nanopartícula, onde a fase oleosa desta nanopartícula foi formada por óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e *Cymbopogom flexuosus* e monooeleato de sorbitano 80 vertida em uma fase aquosa sob agitação formada por polisorbato 80 e um tampão ácido contendo quitosana dissolvida em ácido acético sendo as ditas nanopartículas incorporadas em cremes comerciais para uso como agente com comprovada atividade antimicrobiana.

2. “PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS REVESTIDAS DE QUITOSANA CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL COMO ALTERNATIVA ANTIMICROBIANA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** nanopartícula poder ser produzida contendo apenas um dos óleos essenciais ou associação entre eles sendo estes óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e *Cymbopogom flexuosus*.

3. “PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS REVESTIDAS DE QUITOSANA CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL COMO ALTERNATIVA ANTIMICROBIANA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** fase aquosa ser preparada pela adição do polisorbato 80 a água acidificada sob suave agitação e após isso, ocorrer a adição da quitosana previamente dissolvida em ácido acético.

4. “PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS REVESTIDAS DE QUITOSANA CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL COMO ALTERNATIVA ANTIMICROBIANA”, de acordo com as reivindicações 1 e 4 **caracterizado pela** água acidificada ser produzida a partir de um ácido compreendendo ácido cítrico, lático ou um tampão compreendendo o tampão citrato, fosfato de sódio, tris, citrato-fosfato, acetato de sódio e glicina-HCl.

5. “PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS REVESTIDAS DE QUITOSANA CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL COMO ALTERNATIVA ANTIMICROBIANA”, de acordo com as reivindicações 1, **caracterizado**

pelas nanopartículas de quitosana contendo óleo essencial *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e *Cymbopogom flexuosus* poderem ser utilizadas no tratamento da mastite bovina.

RESUMO

“PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS REVESTIDAS DE QUITOSANA CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL COMO ALTERNATIVA ANTIMICROBIANA”

A presente invenção descreve um processo de obtenção de nanopartículas de quitosana contendo óleos essenciais de *Origanum vulgare, Cymbopogom flexuosus e Thymus vulgaris*. A nanopartícula foi produzida por processo de nanoprecipitação por agitação magnética contendo uma solução de quitosana em ácido acético, óleo essencial e surfactantes. Esta nanopartícula pode ser utilizada como sistema de liberação controlada de óleos essenciais no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* como a mastite bovina, pois utiliza materiais biocompatíveis, de baixa toxicidade e com atividade antimicrobiana comprovada contra a *S. aureus*, além disso a carga positiva apresentada pelas nanopartículas elimina possíveis repulsões eletrostáticas entre as ditas nanopartículas e cepas de *S. aureus*.

6. CONCLUSÕES

Tendo em vista a importância de estudos que avaliem o potencial antimicrobiano de óleos essenciais frente ao tratamento da mastite bovina, podemos concluir que os resultados dos testes da concentração inibitória mínima (MIC) confirmou a atividade antimicrobiana dos óleos de *Cymbopogon flexuosus, Thymus vulgaris* e *Origanum vulgare* contra as quatro Cepas de *Staphylococcus aureus*, e dentre os óleos estudados, o OE de *O. vulgare* apresentou maior bioatividade contra essas cepas em relação aos demais óleos testados. E diante dos resultados obtidos que indicaram a atividade antimicrobiana dos óleos de *O. vulgare, T. vulgaris e C. flexuoxus,* é sugerido que seja considerado uma concentração de 75% de *O. vulgare* e 25% de *C. flexuosus* na composição do creme/pomada para otimizar a atividade antimicrobiana da mistura dos óleos. Ainda, o desenvolvimento de nanopartículas revestida por quitosana e composta pelos óleos essenciais *O. vulgare, T. vulgaris e C. flexuoxus* apresentaram resultados consistentes, caracterizando-se com monodispersas, com carga eletrostática variando em positiva e negativa, diante disso é sugerido que sejam utilizadas as amostras de nanopartículas com carga positiva que podem ter atração eletrostática por *S. aureus*. Além disso as nanopartículas apresentaram melhor resultado em relação a atividade antimicrobiana contra as cepas de *S. aureus*, cujo resultado foi de duas a oitos vezes melhor que os resultados obtidos com os OEs isolados de *O. vulgare, T. vulgaris e C. flexuoxus.* Ainda, as nanopartículas poderão ser incorporadas na base do creme ou pomada podendo aumentar o seu potencial antimicrobiano.

7. Anexo 1- Trabalhos Publicados durante a realização do mestrado

SILVA, N.P.C.; BITTENCOURT, T. Q. M.; SANTOS, T. P.; MAGNABOSCO, A. R. S.; SILVA, M. C. G.; SILVA, J. F.; BASTOS, P. E. S.; PADILHA, R. M. O.; CADENA, M. R. S.; CADENA, P. G. Efeitos tóxicos de fármacos antidiabéticos como poluentes sob os parâmetros biológicos do peixe zebrafish (Danio rerio). v. 13, n. 8, p. 1-12, 2021.