



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

DIRLIANE SANTOS DUARTE

**PREPARAÇÃO DE FORMULAÇÃO SANITIZANTE À BASE DE
ÓLEO ESSENCIAL NANOENCAPSULADO VISANDO O CONTROLE
DE DOENÇAS EM CAPRINOS E OVINOS**

JUAZEIRO – BA

2022

DIRLIANE SANTOS DUARTE

**PREPARAÇÃO DE FORMULAÇÃO SANITIZANTE À BASE DE
ÓLEO ESSENCIAL NANOENCAPSULADO VISANDO O
CONTROLE DE DOENÇAS EM CAPRINOS E OVINOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências dos Materiais, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Orientador: Prof. Dr. Douglas de Britto

JUAZEIRO – BA

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

FOLHA DE APROVAÇÃO

DIRLIANE SANTOS DUARTE

**PREPARAÇÃO DE FORMULAÇÃO BACTERICIDA À BASE DE ÓLEO
ESSENCIAL NANOENCAPSULADO VISANDO O CONTROLE DE
DOENÇAS EM CAPRINOS E OVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Juazeiro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Aprovada em: 22 de dezembro de 2022.

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
gov.br DOUGLAS DE BRITTO
Data: 16/01/2023 21:20:00-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Douglas de Britto - EMBRAPA SEMIÁRIDO / PGCM-UNIVASF

Documento assinado digitalmente
gov.br ANDREA DE VASCONCELOS FERRAZ
Data: 16/01/2023 21:42:13-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Andrea de Vasconcelos Ferraz – PGCM-UNIVASF

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSIR LAINE APARECIDA VESCHI
Data: 19/01/2023 11:23:48-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Josir Laine Aparecida Veschi - EMBRAPA SEMIÁRIDO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser minha fortaleza e minha força em todos os momentos na minha vida, por nunca largar minha mão, por sempre estar no comando e providenciando tudo no seu tempo – À Ele toda honra e glória.

Aos meus pais, Domingos Duarte e Maria Petronila, meu irmão, Dirley Santos, e em especial ao meu esposo, Emerson Alencar, por todo apoio, compreensão e incentivo, por nunca me deixar desiste.

Ao professor/orientador Dr. Douglas de Britto por vir me ajudando no meu progresso acadêmico desde 2015, pela sua dedicação, paciência e apoio na elaboração deste trabalho dia após dia. Obrigado por esclarecer inúmeras dúvidas que surgiram durante o processo e ser tão gentil.

À Pesquisadora Dra. Ana Valéria Vieira de Souza (Embrapa Semiárido) pela extração e disponibilidade do óleo essencial, bem como cessão da bolsa de pesquisa em seu projeto.

Ao convênio Embrapa Semiárido – CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa.

Ao técnico do Laboratório de Sanidade Animal, Edmilson Dantas, por todo ensinamento e dedicação que teve comigo durante esse período no laboratório, por se torna um amigo que incentivou e motivou diariamente.

À Professora Dra. Josir Laine Aparecida Veschi, por ceder o laboratório e pelos ensinamentos transmitidos.

Às Professoras Dra. Andrea de Vasconcelos e Dra. Josir Veschi pelo paciente trabalho de revisão da redação e contribuições tão relevantes ao meu trabalho.

A todos os meus amigos que sempre estiveram torcendo por mim, em especial a Alexandra Fonseca.

RESUMO

A região Nordeste é a região maior produtora de caprinos e ovinos do país. No entanto, problemas de ordem sanitária têm reduzido seu potencial produtivo. Entre esses destaca-se a mastite, infecção causada por microrganismos patogênicos. Visando explorar o potencial antimicrobiano de plantas nativas, esta pesquisa avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia grata* encapsulado em nanopartículas de quitosana ou trimetilquitosana. Com isso foi possível desenvolver uma formulação com ação sanitizante contra cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, causadoras da mastite em cabras leiteiras. As nanopartículas foram preparadas via gelificação iônica com tripolifosfato de sódio e encapsuladas com óleo essencial de *L. grata*. A eficiência de encapsulamento foi de 77% e 82 % para as nanopartículas de quitosana (NP_{QUI+OE}) e trimetilquitosana (NP_{TMQ+OE}), respectivamente. A caracterização por espectroscopia no infravermelho apresentou mudanças nos padrões de bandas NH₂ e OH, indicando a formação de nanopartículas. Técnicas como antibiograma, concentração bactericida mínima (CIM), concentração inibitória mínima (CBM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram atividade para o óleo essencial, as nanopartículas e as formulações de detergente. A amostra com maior atividade antimicrobiana foi a NP_{TMQ+OE}, com CIM e CBM < 15,62 ppm. Para as quatro formulações de detergente propostas, as características físico-químicas foram adequadas, com exceção daquela com NP-OE_{QUI}, em que houve formação de fase. Desta forma, foi demonstrado que o óleo essencial de *L. grata* apresenta atividade antimicrobiana, sendo potencializado pelo encapsulamento. O encapsulamento permitiu agregar também ação bactericida à base detergente comum, sendo uma alternativa para a tratamento da mastite por meio da higienização do material a seu utilizado durante a ordenha.

Palavras-chave: Segurança zoossanitária. Quitosana. Antibiótico. Plantas medicinais.

ABSTRACT

The Northeast region is the largest producer of goats and sheep in the country. However, health problems reduced its productive potential. Among these, mastitis stands out, an infection caused by pathogenic microorganisms. Aiming to explore the antimicrobial potential of native plants, this research evaluated the antimicrobial activity of *Lippia grata* essential oil encapsulated in chitosan or trimethylchitosan nanoparticles. With this, it was possible to develop a detergent with sanitizing action against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, which cause mastitis in dairy goats. The nanoparticles were prepared via ionic gelation with sodium tripolyphosphate and encapsulated with essential oil of *L. grata*. The encapsulation efficiency was 77% and 82% for chitosan (NP_{QUI+OE}) and trimethylchitosan (NP_{TMQ+OE}) nanoparticles, respectively. Characterization by infrared spectroscopy showed changes in the NH₂ and OH band patterns, indicating the formation of nanoparticles. Techniques such as antibiogram, minimum bactericidal concentration (MIC), minimum inhibitory concentration (MBC) and scanning electron microscopy (SEM) showed activity for essential oil, nanoparticles and detergent formulations. The sample with the highest antimicrobial activity was NP_{TMQ+OE}, with MIC and MBC < 15.62 ppm. For the four proposed detergent formulations, the physicochemical characteristics were adequate, with the exception of the one with NP-OE_{QUI}, in which there was phase formation. Thus, it was demonstrated that the essential oil of *L. grata* has antimicrobial activity, being potentiated by encapsulation. The encapsulation also allowed to add bactericidal action to the common detergent base, being an alternative for the treatment of mastitis by cleaning the material used during milking.

Keywords: Zoosanitary safety. Chitosan. Antibiotic. Medicinal plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Número de rebanho por região do Brasil.....	15
Figura 2 – Coloração de Gram para <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> mostrando cocos Gram positivos e bastonetes Gram negativos.....	17
Figura 3 – Aspecto da planta <i>Lippia grata</i> Schauer.....	20
Figura 4 – Representação de quitina e da quitosana e as respectivas alterações nos grupos funcionais	23
Figura 5 – Representação da reação de trimetilação da quitosana.....	25
Figura 6 – Modelo de geleificação da quitosana e TPP por interação entre grupos iônicos e catiônicos	28
Figura 7 – Aspecto da suspensão de nanopartículas com óleo essencial (NP-OE) em diferentes concentrações.....	34
Figura 8 – Esquema representativo do procedimento dos testes de CIM e CBM.....	40
Figura 9 – Detalhamento do procedimento do preparo do detergente sanitizante.....	42
Figura 10 – Aspecto das suspensões de NP em DMSO 1,5% a partir dos diferentes materiais.....	44
Figura 11 - Espectros de FTIR da quitosana e do derivado trimetilquitosana (TMQ), destacando as principais bandas características de absorção.....	47
Figura 12 - Espectros de FTIR para amostras de nanopartículas sintetizadas a partir de quitosana, NP _{QUI} , e do derivado trimetilado, NP _{TMQ} , em comparação com os respectivos espectros originais.....	48
Figura 13 - Espectros de FTIR para amostras de nanopartículas encapsuladas com óleo essencial de <i>L. grata</i> a partir de quitosana, NP-OE _{QUI} , e do derivado trimetilado, NP-OE _{TMQ} , em comparação com os respectivos espectros de NP _{QUI} e NP _{TMQ}	49
Figura 14 – Antibiograma para as cepas <i>S. aureus</i>	50
Figura 15 – Antibiograma para as bactérias <i>E. coli</i>	51
Figura 16 – Imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura da cepa de <i>E. coli</i> sem tratamento (a) e com os tratamentos (b) OE e (c) NP-OE _{QUI}	55
Figura 17 – Imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura da cepa de <i>S. aureus</i> sem tratamento (a) e com os tratamentos (b) OE e (c) NP-OE _{QUI}	56
Figura 18 – Foto das quatro formulações de detergente e em destaque a que contém as NP- OE _{TMQ} e NP-OE _{QUI}	57
Figura 19 – Representação gráfica de tempo (dias) versus absorbância em 350 nm para os diferentes materiais.....	59

Figura 20 – Formulações de detergente com aspectos distintos com e sem agitação.....	60
Figura 21 – Foto das amostras dos detergentes no sexto dia de avaliação sem agitação.....	60

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1 – Descrição das etapas realizadas.....	32
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Representação esquemática das amostras, concentrações e análise utilizadas (antibiograma, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima) para os testes da atividade antimicrobiana.....	36
Tabela 2 – Eficiência de Encapsulamento (EE) para nanopartículas de quitosana (NP-OE _{QUI}) e trimetilquitosana (NP-OE _{TMQ}) encapsuladas com OE de <i>Lippia grata</i>	45
Tabela 3 – Variação das concentrações inicial (C _i) e final (C _f) e da Eficiência de Encapsulamento (EE) para suspensões de nanopartículas (NP-OE _{QUI}) encapsuladas com OE de <i>L. grata</i> em meio DMSO 1,5%.....	45
Tabela 4 – Principais bandas de absorção da quitosana, TMQ, NP-OE _{QUI} , NP-OE _{TMQ} , NP _{QUI} e NP _{TMQ}	46
Tabela 5 – Diâmetros dos halos de inibição do OE de <i>L. grata</i> frente às bactérias <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	51
Tabela 6 – Valores de CIM e CBM (ppm) contra <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> para os difentes materiais estudados: óleo essencial de <i>Lippia grata</i> , nanopartículas (NP _{QUI} , NP _{TMQ}), nanopartículas encapsuladas (NP-OE _{QUI} , NP-OE _{TMQ}) e os polímeros originais (QUI, TMQ).....	53
Tabela 7 – Resultados dos valores de pH e espumação das quatro formulações preparadas a partir da base de detergente.....	57

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
DA	Grau de desacetilação
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Eficiência de encapsulamento
HAc	Ácido acético
NP	Nanopartículas
NP-OE	Nanopartículas encapsulada com óleo essencial
OE	Óleo essencial
QUI	Quitosana comercial
RCF	Relação centrífuga de força
TMQ	N,N,N-trimetilquitosana
TPP	Tripolifosfato de sódio
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1. SANIDADE ANIMAL E CONTROLE DA MASTITE EM OVINOS E CAPRINOS	15
3.1.1. Microrganismo causadores da mastite e tratamentos convencionais	17
3.1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
3.1.1.2. <i>Escherichia coli</i>	18
3.1.1.3. Tratamentos convencionais	18
3.2. ANTIMICROBIANOS DE ORIGEM VEGETAL.....	19
3.2.1. Atividade biológica do óleo essencial de <i>Lippia grata</i> Schauer	20
3.3. MATERIAIS POLIMÉRICOS NATURAIS PARA ENCAPSULAMENTO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS	22
3.3.1 Quitosana	22
3.3.2. N,N,N-Trimetilquitosana (TMQ)	25
3.4. NANOENCAPSULAMENTO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS.....	26
3.4.1 Nanoencapsulamento do Óleo Essencial <i>L. grata</i>/Quitosana	26
3.5 USO DE DETERGENTES SANITIZANTES.....	28
3.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR – ATR)	30
3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Lippia grata</i>	33
4.2. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS E ENCAPSULAMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Lippia grata</i>	33
4.2.1. Curva de calibração do DMSO 1,5%	34
4.2.2. Estudo da Eficiência de encapsulamento	34
4.3 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA EM FOURIER (FTIR).....	35
4.4 OBTENÇÃO DAS CEPAS DAS BACTÉRIAS.....	35
4.5 TESTE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	35
4.5.1 Teste de sensibilidade a antimicrobiano (antibiograma)	36
4.5.1.1. Preparo dos discos antimicrobianos.....	37
4.5.1.2. Teste de antibiograma	37
4.5.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	37
4.5.3. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	38
4.5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	38
4.6 TESTES DA FORMULAÇÃO SANITIZANTE.....	41
4.6.1 Caracterizações físico-químicas	42
4.6.1.1 Potencial Hidrogeniônico (pH).....	42
4.6.1.2 Espumação.....	42
4.6.1.3 Estabilidade	43

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO.....	44
5.2 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	46
5.3. TESTE DA ATIVIDADE MICROBIANA.....	49
5.3.1. Antibiograma	49
5.3.2. Teste de microdiluição – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM)	51
5.3.3. Análise de microscopia eletrônica de Varredura (MEV)	54
5.4. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA FORMULAÇÃO.....	56
6. CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

A produção de ovinos e caprinos no Semiárido brasileiro é uma atividade, muitas das vezes, relacionada à agricultura familiar, porém alguns problemas de ordem sanitária acarretam a diminuição do potencial produtivo dos animais. Dentre eles, destaca-se a mastite, como a doença que causa grandes prejuízos na pecuária leiteira, e que se caracteriza por um processo inflamatório da glândula mamária, podendo estar associada à agentes bacterianos (ALVES E MOREIRA, 2021).

A mastite, na maioria das vezes, está relacionada com o manejo antes, durante e após a ordenha. Dessa forma, explica-se a necessidade da conscientização do ordenhador diante dos procedimentos de ordenha, envolvendo maneiras adequadas de higienização e desinfecção do local e dos utensílios utilizados durante as ordenhas e entre as ordenhas (BRAGA et al., 2015). Existem diversos microrganismos associados a essa doença, dentre os principais se destacam nos casos de mastite em pequenos ruminantes no Brasil são *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., bem como outras espécies de bactérias anaeróbias, alguns fungos e até leveduras (OLIVEIRA et al., 2011).

O tratamento mais utilizado no controle da mastite, são as drogas como penicilinas, estreptomicina, cefalosporina e tetraciclina (BEURON et al., 2014). Até 2017 as cefalosporinas foram o grupo de antimicrobianos mais utilizadas no tratamento dessa enfermidade, segundo Langoni et al. (2017). No entanto, o principal obstáculo são os resíduos do antimicrobiano no leite, devendo-se descartá-lo durante o período de carência do medicamento (FERNANDES, FEIJÓ E RODRIGUES; 2019) e o aumento de resistência bacteriana, sobretudo por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. (FANIN, ALAVOINE E BERTRAND, 2020).

Nesse cenário, o uso de antimicrobianos de origem vegetal vêm demonstrando ser medicamentos promissores para o controle de doenças infecciosas. Estes compostos vegetais são adotados por diversos povos pelo mundo, pois produzem uma ampla e diversificada variedade de compostos orgânicos (MACEDO, 2019). O diferencial desses antimicrobianos para os tradicionais está na eficiência do combate aos microrganismos resistentes e ao fato de não produzir de resíduos no leite, tornando-a um tratamento alternativo.

O Brasil possui uma variedade grande de plantas nativas e exóticas distribuídas entre cinco principais biomas, entre eles a Caatinga, (SILVA et al., 2019). Dentre as diversas utilizações desses vegetais nativos da Caatinga encontramos está a sua utilização como medicamento natural por populações locais para tratamento de várias doenças. Dentre as plantas utilizadas pela população nordestina como medicamento natural se encontra a *Lippia grata*, conhecida como alecrim-da-chapada ou alecrim-do-serrote. Esta planta produz um óleo essencial o qual é responsável por sua atividade antimicrobiana.

Os principais compostos bioativos presentes no óleo essencial de *L. grata*, são o timol e o carvacrol. Estes compostos possuem ação fungicida e bactericida frente a diversos microrganismos de importância para a saúde humana e animal, como *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Escherichia spp.*, dentre outros (COSTA et al., 2017).

Outro composto que apresenta atividade antimicrobiana é a quitosana e seus derivados (BRITTO E ASSIS, 2012). A quitosana é um polímero biodegradável, biocompatível e atóxico, encontrado naturalmente em alguns fungos, e de forma mais comum, como um derivado do processo de desacetilação química da quitina. Entretanto, a quitosana possui limitações em algumas aplicações, como a sua solubilidade em pH neutro ou alcalino. Um derivado da quitosana, obtido por modificação química, é o sal quaternário de quitosana, N,N,N-trimetilquitosana (TMQ, este tem superado estas limitações originais (BRITTO et al, 2020). A TMQ tem apresentado melhor solubilidade e maior resposta antimicrobiana contra várias cepas bacterianas resistentes, tais como *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* e *P. aeruginosa* (LI et al., 2019).

A combinação do óleo essencial de *L. grata* com os polímeros por meio da nanoencapsulação, garante estabilidade e preservação por tempo maior e sob condições ambientais mais desfavoráveis ao OE, já que são instáveis e susceptíveis à degradação na presença de oxigênio, luz e temperatura. Além de permitir que as estruturas da quitosana e seus derivados sejam melhoradas significativamente quanto a atividade antimicrobiana (BILIA et al., 2014). Diante disso, o objetivo desse trabalho foi estabilizar o óleo essencial de *L. grata* com a nanoencapsulação de quitosana ou TMQ com tripolifosfato de sódio (TPP), visando o desenvolvimento de um detergente com ação no controle de bactérias como *E. coli* e *S. aureus*, causadores da mastite.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma formulação com ação efetiva no controle de cepas bacterianas que causam mastite em caprinos e ovinos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial de *L. grata* livre e nanoencapsulado frente as cepas de *E. coli* e *S. aureus*;
- Sintetizar nanopartículas de quitosana e N,N,N trimetilquitosana (TMQ) com tripolifosfato de sódio;
- Encapsular e avaliar a eficiência de encapsulamentos de nanopartículas de quitosana e TMQ com óleo essencial de *L. grata* usando o dimetilsulfóxido (DMSO) à 1,5 % como solvente;
- Caracterizar as nanopartículas puras de quitosana e TMQ e contendo óleo essencial de *L. grata* pela técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.
- Avaliar a alteração morfológicas nas células de *S.aureus* e *E. coli* com tratamento de óleo essencial livre e encapsulado.
- Realizar testes de estabilidade em base detergente a partir da adição de óleo essencial livre e encapsulado.

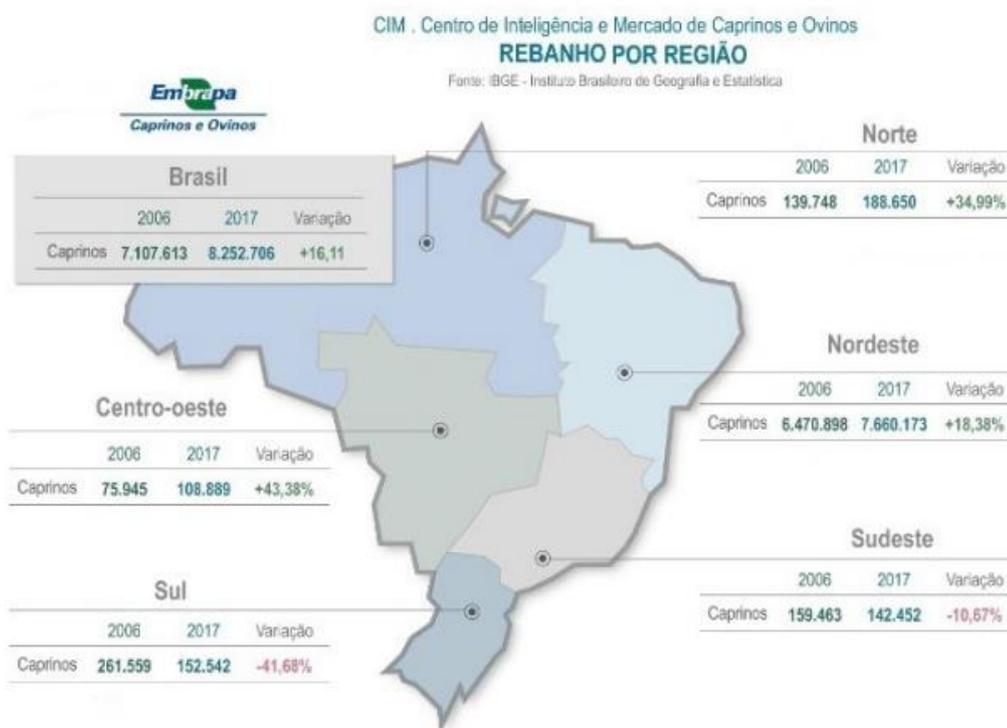
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 SANIDADE ANIMAL E CONTROLE DA MASTITE EM OVINOS E CAPRINOS

A caprinocultura e a ovinocultura no Brasil têm um papel de grande importância socioeconômica, principalmente para o Nordeste. A exploração da carne, leite e da pele dos caprinos e ovinos garante fonte de renda, trabalho e alimentação para muitas famílias, sendo, portanto, um importante instrumento gerador de empregos e renda fixando o homem no campo (SOUZA et al., 2017).

A caprinocultura no Brasil vem se consolidando como uma atividade rentável, estando presente em todas as regiões do país. Sua grande maioria se concentra na região Nordeste (Figura 1). A região Nordeste destaca-se no cenário produtivo de caprinos, com 92,8% dos animais e 88,6% dos estabelecimentos com rebanhos de caprinos do país (IBGE, 2017).

Figura 1 - Número de rebanho por região do Brasil.



FONTE : IBGE (2017).

Para Andrade (2021), a região semiárida do Nordeste brasileiro, por suas características climáticas, apresenta as condições ideais para que esses animais apresentem um melhor desenvolvimento, pois são muito adaptados à vegetação Caatinga. No entanto, os criadores de caprinos e ovinos vêm enfrentando muitas dificuldades, como a redução da produção de leite, o descarte precoce de matrizes, a redução do valor comercial dos animais, devido problemas sanitários, e a ocorrência de doenças e a proliferação de microrganismo causadores dessas doenças, dentre elas, podemos destacar a mastite.

A mastite, por sua vez, é uma enfermidade caracterizada pela inflamação da glândula mamária, em decorrência da ação de agentes biológicos, físicos ou químicos, e é considerada uma doença plurietiológica e multifatorial (ALVES et al, 2019). Essa doença afeta negativamente o setor leiteiro, pois causa alterações na composição físico-química e microbiológica do leite (GUIMARÃES et al., 2017).

A mastite pode se apresentar de duas formas, denominadas clínica e subclínica. A primeira manifesta sinais clínicos visíveis, ou seja, alterações na glândula mamária, tais como: edema, endurecimento, aumento da temperatura local e sinais de dor. Além de alterações físico-química no leite detectáveis pela presença de grumos e alteração na coloração; enquanto a forma subclínica apresenta-se assintomática, sem alterações clínicas perceptíveis na glândula mamária. Entretanto ocorre alteração na composição físico-química do leite como, por exemplo, aumento o número de células somáticas e das concentrações de cloro e sódio (SANTOS, 2021).

Em ambos os casos a mastite em pequenos ruminantes pode ocorrer durante todo ano, não havendo variação sazonal da doença e podem ser observadas, como maior prevalência de infecções intramamárias em períodos chuvosos (PEIXOTO, MOTA E COSTA; 2010). A mastite já foi identificada em todos os países com criação de caprinos e ovinos leiteiros. No Brasil, os rebanhos leiteiros de caprinos e ovinos destacam-se com maior frequência os casos de mastite subclínica. Em estudo realizado por Santos et al. (2019), no estado da Paraíba, os sinais clínicos da mastite foram relatados em 51,2% dos rebanhos dos quais de 5% a 30% para mastite subclínica tendo como principal patógeno isolados nessa pesquisa *S. aureus* e *E. coli*, essa última sendo exclusivamente isolada de ovinos.

A mastite subclínica pode apresentar-se sob a forma contagiosa e ambiental em que os principais agentes etiológicos causadores são comumente agrupados, quanto

à sua forma e modo de transmissão, em dois grupos: microrganismo das mastites contagiosas e microrganismo das mastites ambientais (SANTOS, 2021). A primeira forma da doença tem como agente etiológicos as bactérias Gram positivas tais como: *Corynebacterium bovis*, *S. aureus* e o *S. agalactiae* (ALVES et al., 2019). Enquanto a mastite ambiental são as bactérias Gram negativas tais como *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *E. coli*, *Klebsiella* e *Enterobacter* (MASSOTE et al., 2019).

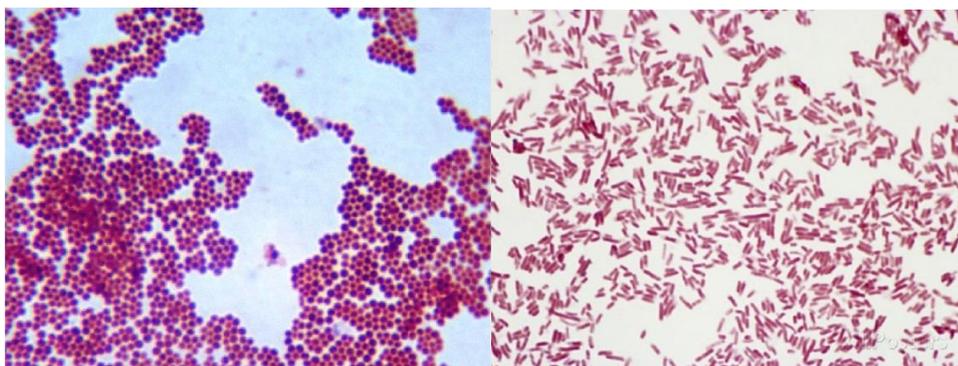
Em outro estudo realizado sobre os principais microrganismos isolados de casos de mastite em pequenos ruminantes no Brasil foi possível observar que existem inúmeros agentes causadores da mastite entre esses estão *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, bem como outras espécies de bactérias anaeróbias, alguns fungos e até leveduras (OLIVEIRA et al., 2011).

3.1.1 Microorganismo causadores da mastite e tratamentos convencionais

3.1.1.1 *Staphylococcus aureus*

A *S. aureus* pertence a um grupo diversificado de bactérias Gram positivas. Apresenta-se como cocos, aos pares ou formando cadeias e cachos dependendo do tamanho, pois medem de 0,5 a 1,0 μm e se agrupam em massas irregulares. São imóveis, anaeróbios facultativos, suas colônias são opacas e podem ter coloração esbranquiçada ou creme e algumas vezes amarelo-douradas, com temperatura de crescimento em torno de 30° a 37°C (CARLOS et al., 2022) (Figura 2).

Figura 2 - Coloração de Gram para *S. aureus* e *E. coli* mostrando cocos Gram positivos e bastonetes Gram negativos.



FONTE: SOLIMAN et al., (2014) e DA SILVA, (2020)

A *S. aureus* causa enfermidades que vão desde infecções de pele a infecções fatais como bacteremia. Essa bactéria é uma das causas mais frequentes de infecções hospitalares e associadas ao uso de dispositivos médicos, também é a principal causa de infecções associadas com a formação de biofilme (PORTO, 2020).

S. aureus exposta em superfícies pode sobreviver por meses, apresenta grande resistência aos antibióticos tradicionais, uma vez que seu genoma é composto por cerca de 300.000 pares a mais em relação a outra espécie do gênero, inferindo em uma gama de fatores de virulência e meios de evadir as defesas do hospedeiro. Isso limita a eficácia terapêutica e torna-se um problema para o tratamento de infecções crônicas (SOUSA JÚNIOR, et al. 2021).

3.1.1.2 *Escherichia coli*

E. coli é um bastonete Gram negativo pertencente à família Enterobacteriaceae (Figura 2). Essa família possui grande importância microbiológica e médica devido às infecções que pode causar, patogenicidade e ao surgimento de cepas multirresistentes aos antibióticos utilizados na terapêutica (PORTO, 2020).

A maioria dos gêneros e espécies pertencentes à família Enterobacteriaceae apresentam características como bastonetes Gram-negativos curtos e retos. São anaeróbias facultativas, crescem a 37°C. Estas bactérias estão dispersas na natureza e podem ser encontradas em plantas, solo, água e microbiota normal do trato intestinal dos animais e humanos. Podem estar associadas a infecções comunitárias e hospitalares, oportunistas ou não (BARROS et al., 2012).

3.1.1.3 Tratamentos convencionais

Para ambas as bactérias citadas anteriormente, o uso de medicamentos antimicrobianos ainda é a principal estratégia para tratamento e combate desses microorganismos causadores da mastite subclínica. Sabe-se que comumente são utilizados medicamentos como penicilina, estreptomicina, amoxicilina, cloxacilina, eritromicina, cefalosporina e tetraciclina (BEURON et al., 2014). As cefalosporinas têm sido amplamente utilizadas no tratamento das mastites, independente do microrganismo causador (LANGONI et al., 2017).

Entretanto, o uso desses antimicrobianos requer cuidados especiais, tendo como principais em traves o desenvolvimento de resistência devido ao uso

inadequado e a presença de resíduo de antimicrobiano no leite. Nesse caso, deve-se descartar o leite durante o período de carência do medicamento (FERNANDES, FEIJÓ E RODRIGUES; 2019).

Diante disso, substâncias extraídas de plantas vêm despertando interesse como alternativas terapêuticas, tornando-se candidatas ao desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (DE BARROS et al., 2017). Nas últimas décadas, diversas pesquisas foram desenvolvidas usando partes de plantas (raiz, caule, folhas, flores e frutos) para avaliar suas atividades farmacológicas, gerando dados importantes e resultados satisfatórios, sobretudo, para atividades anti-inflamatórias, antineoplásica, anti-hipertensiva, antiarrítmica, analgésicas e antimicrobiana (CORRÊA, 2018).

3.2 ANTIMICROBIANOS DE ORIGEM VEGETAL

As plantas produzem uma ampla e diversificada variedade de compostos orgânicos bioativos, oriundos de seus metabólicos, que podem ser extraídos de folhas, flores, caule, casca, frutos e sementes (BELMONTE, 2019). Esses compostos apresentam pontos positivos em relação a sua utilização frente aos microorganismos, devido à resistência a alguns antimicrobianos convencionais, muitas vezes ocasionado pelo uso indiscriminado dos mesmos (PARACAMPO, 2017).

Pesquisas têm investigado óleos essenciais (OE) como uma alternativa capaz de inibir bactérias causadoras de infecções provocadas por *E. coli* e *S. aureus*, responsáveis pela mastite. Como avaliado por Pereira et al. (2008), que investigaram atividade antibacteriana dos OE de *Satureja montana*, *Cymbopogon nardus* e *Citrus Limonia* sobre *S. aureus* e *E. coli*; e concluíram com este teste *in vitro* o grande potencial destes óleos como uma alternativa aos antimicrobianos e conservantes sintéticos.

Silva et al. (2009), também testaram a ação antibacteriana de seis óleos essenciais (*Rosmarinus officinalis* L., *Caryophyllus aromaticus* L., *Zingiber officinalis* R., *Cymbopogon citratus* *Mentha piperita* L., *Cinnamomum zeilanicum* B.) frente a cepas de *S. aureus* e *E. coli*. Assim como, DE CASTRO GUIMARÃES et al. (2017), que avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso e do OE das espécies *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) e *Caryophyllus aromaticus* L. (cravo da Índia). Em ambos experimentos foi verificado o potencial inibitório frente as linhagens de *E. coli* e *S. aureus*.

Os OE de *Thymus vulgaris* (tomilho), *Elettaria cardamomum* (cardamomo), *Eugenia caryophyllus* (cravo da Índia), *Foeniculum vulgare* (funcho doce), *Origanum vulgare* (orégano) e *Piper nigrum* (pimenta preta), entre outros foram testados quanto as suas atividades antimicrobiana frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, como *E. coli* e *S. aureus*, e todos apresentaram-se como uma alternativa de tratamento contra esses microorganismos (ARAÚJO E LONGO , 2016; PEREIRA E CARDOSO , 2012; ARAÚJO et al., 2015; MILLEZI et al., 2013; DA SILVA et al., 2018; RODRIGUES, SANTOS, FORTUNA, 2020).

Diversos pesquisadores salientam a diferença do potencial antimicrobiano dos OE diante de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Na pesquisa de Araujo e Longo (2016), por exemplo, em que se determinou a composição química e avaliou a suscetibilidade do OE de orégano frente as cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella choleraesuis*, verificou-se que a *S. aureus* foi mais suscetível do que a *E. coli* e a *Salmonella choleraesuis*.

3.2.1 Atividade biológica do óleo essencial de *Lippia grata* Schauer

A *L. grata* Schauer, também conhecida como alecrim do sertão, alecrim do mato, alecrim do planalto ou tábua de alecrim é uma planta pertencente à família Verbenaceae que compreende mais de 35 gêneros, com mais de 200 espécies de ervas, arbustos e subarbustos (COSTA, 2019). Essa espécie apresenta porte arbustivo, podendo alcançar até 2 m de altura, com caule quebradiço e ramificado desde a base, folhas simples com borda serrilhada e flores brancas, tubulares, reunidas em inflorescência do tipo espiga (SOUZA E KILL , 2018) (Figura 3).

Figura 3 - Aspecto da planta *Lippia grata* Schauer.



FONTE: SOUZA E KILL, 2018

No gênero *Lippia*, o OE é secretado e armazenado por tricomas glandulares, sendo o timol e carvacrol os compostos majoritários responsáveis pelas atividades antimicrobiana, antioxidante e antitumoral (TREVISAN et al., 2016). A principal composição química das espécies de *Lippia* evidenciam, principalmente, os constituintes voláteis, como também outros constituintes como esteroides, flavanoides, saponinas e xantonas, que também foram relatados como constituintes nesse gênero (RAFFA et al., 2017).

Os OE são compostos naturais etéreos ou voláteis de complexa composição química, formados a partir do metabolismo secundário de plantas aromáticas, que estão presentes em diversas partes das plantas, sendo estes compostos geralmente responsáveis pelos odores e/ou sabores característicos das plantas das quais são obtidos (FRANÇA, 2019), podendo contribuir também para ações específicas, incluindo a defesa contra microorganismos.

A ação microbiana dos óleos essenciais está relacionada principalmente aos compostos bioativos presentes. O OE da *L. grata*, por exemplo, possui como compostos majoritários o timol e o carvacrol, que são substâncias utilizadas como fungicida e bactericida contra microorganismos de importância para a saúde humana e animal, como *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Escherichia spp.*, dentre outros (COSTA et al., 2017).

A composição química de óleos essenciais de *Lippia grata* é muito variável, inclusive mesmo dentro da mesma espécie, isso se dá devido a interação da planta com o meio ambiente. Por isso, o período de colheita, técnica de extração, fatores genéticos, tipo de adubação, entre outros, deve ser levado em consideração quando se trabalha com óleos essenciais (SOUZA E KILL, 2018). Os OE podem ser extraídos por diversos métodos, como a utilização de solvente orgânico, CO₂ supercrítico, forno de microondas, prensagem, arraste a vapor, hidrodestilação, microextração em fase sólida, enfloração, entre outros, podendo variar de acordo com a utilização do óleo (BAPTISTA, 2018).

Dentre os métodos, citados, o mais aplicado para a extração desses óleos é a hidrodestilação em aparelho de Clevenger, em que o óleo é obtido por meio de destilação por arraste com vapor d'água. Esse método não apresenta dificuldades e é o mais utilizado por ser viável economicamente e obtém um óleo essencial de alta qualidade. (SOUZA E KILL, 2018).

Souza (2021), observou que o óleo essencial de *L. grata* agrupa 29 compostos, tais como o carvacrol (78,6%), timol (6,3%), p-cimeno (2,51%), éter metil timol (2,31%), β-cariofileno (1,24%), γ-terpineno (1%) e óxido de cariofileno (0,85%). Dentre esses componentes químicos orgânicos, os terpenos naturais (monoterpenos ou sesquiterpenos) como o carvacrol, timol e p-cimeno tem despertado atenção para as atividades biológicas, pois possuem ação antimicrobiana capaz de causar a ruptura da membrana bacteriana (FERNANDES et al., 2015).

E segundo COSTA (2019), o timol tem sido avaliado por diversos pesquisadores devido as suas atividades anti-inflamatórias e cicatrizantes, levando a sugerir que os monoterpenos presentes no OE da *L. grata* são componentes promissores que poderão ser utilizados no tratamento de processos inflamatórios, bem como a cicatrização de feridas, além de apresentar atividades frente a bactérias.

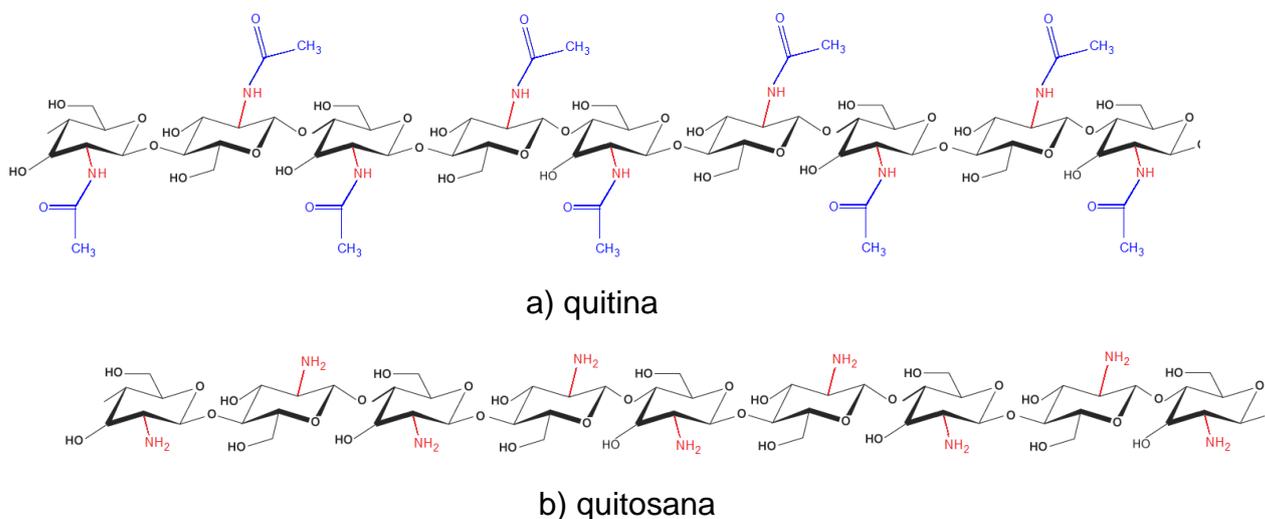
3.3 MATERIAIS POLIMÉRICOS NATURAIS PARA ENCAPSULAMENTO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS

3.3.1 Quitosana

A quitosana é um polímero biodegradável, natural e renovável, de vasto valor econômico e ambiental, considerado o segundo mais abundante na natureza depois da celulose. Essa substância pode ser encontrada em fungos, insetos e artrópodes, sendo extraída das carapaças de caranguejo, camarão e lagosta, resíduos da produção industrial (CASTELLÓ et al., 2018).

A obtenção da quitosana ocorre a partir da desacetilação da quitina, com a retirada do grupo acetila por meio de tratamento químico com hidróxido de sódio, resultando em estruturas repetidas de β-(1-4)-2-acetamido-deoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina), ou seja, D-glucosamina (MODI et al., 2015). De uma forma mais comum a desacetilação da quitina ocorre na transformação parcial dos grupos acetamina da quitina em grupos amina (Figura 4).

Figura 4 - Representação da quitina e da quitosana e as respectivas alterações nos grupos funcionais.



FONTE: O AUTOR.

Segundo Sobreira et al., (2020), o grau de pureza e as propriedades da quitosana podem ser influenciados pela concentração do hidróxido de sódio, tempo e temperatura de reação para desacetilação. Os grupos funcionais restantes como hidroxila ($-OH$) e amina ($-NH_2$) tornam esse biopolímero versátil para diversas aplicações. Por conta disso, a quitosana vem despertando o interesse nos mais diversos campos da ciência, como na agricultura e indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética devido a propriedades como a biocompatibilidade, a biodegradabilidade e a atoxicidade (MARANGON, 2015).

A solubilidade da quitosana é resultado de sua origem biológica, massa molecular e grau de acetilação. É solúvel em meio de ácidos orgânicos e inorgânicos, constituindo um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino originando o íon NH_3^+ , que atribui características peculiares como, por exemplo, a formação de uma solução viscosa apta a desenvolver invólucros ou películas de recobrimento (GARCIA, 2018).

A quitosana é encontrada comercialmente em forma de pó e é caracterizada pela sua massa molecular (MM) e grau de acetilação (DA). A quitosana, que está à disposição no comércio, possui grau de desacetilação $>85\%$ ($DA < 15\%$) e massa molecular contido entre 100-1000 kDa (DE QUEIROZ ANTONINO, 2017). É uma molécula extremamente funcional, exercendo ação antimicrobiana (bactericida, bacteriostática, fungicida e fungistática), antitumoral, agente anticoagulante, agente

hemostático, imunoestimulador, agente cicatrizante, anti-inflamatório, modulador das funções renais, antiviral, antioxidante, redutor dos níveis colesterolêmicos (GAVHANE, GURAV E YADAV, 2013).

Diante disso, a quitosana vem sendo pesquisada como agente antimicrobiano frente a uma extensa variedade de microorganismos como bactérias, leveduras, fungos e algas. Segundo levantamento realizado por GARCIA (2018), a quitosana pode gerar uma inibição do crescimento ou destruição de microorganismos, tais como *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. faecalis*, *S. pyogenes*, *Vibrio*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *P. aeruginosa*, *Candida*, *Xanthomonas campestris*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*.

Pesquisas realizadas evidenciaram que a atividade antimicrobiana da quitosana se diferencia entre as bactérias Gram positivas e Gram negativas. Nas Gram positivas, pressupõe-se que a quitosana fragmenta a membrana, ao passo que nas Gram negativas o citoplasma se aglomera e o espaço intracelular é expandido (CHANDRASEKARAN, KIM, CHUN, 2020; MATICA et al., 2019; GASPAR, PEIXOTO, AMORIM, 2019).

A ação antimicrobiana da quitosana pode ser influenciada por vários fatores tais como a massa molecular, o grau de desacetilação, tipo de bactéria (Gram positiva ou Gram negativa) e composição química (UGARTE, 2012). Uma hipótese da ação antimicrobiana da quitosana ocorre baseado no efeito de permeabilidade da célula, que por meio das interações eletrostáticas da quitosana carregada positivamente com as superfícies celulares das bactérias carregadas negativamente, alteram as propriedades da barreira da membrana dos microorganismos, produzindo uma perda nos componentes intracelulares como eletrólitos e proteínas (HELANDER et al, 2001).

CHUNG et al. (2012), estudaram a atividade antimicrobiana da quitosana contra *S. aureus* e *E. coli* e observaram que a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* aumenta com o aumento da massa molecular da quitosana, e que para *E. coli* a atividade antimicrobiana tem o comportamento inverso, à medida que massa molecular da quitosana diminui aumenta a atividade antimicrobiana. Com isso, dois mecanismos distintos são sugeridos para a atividade antimicrobiana, desta forma, para *S. aureus*, a quitosana na superfície da célula pode formar um polímero na membrana, que inibe a entrada de nutrientes na célula, enquanto para o *E. coli*, a quitosana entra na célula por meio da permeação (UGARTE, 2012).

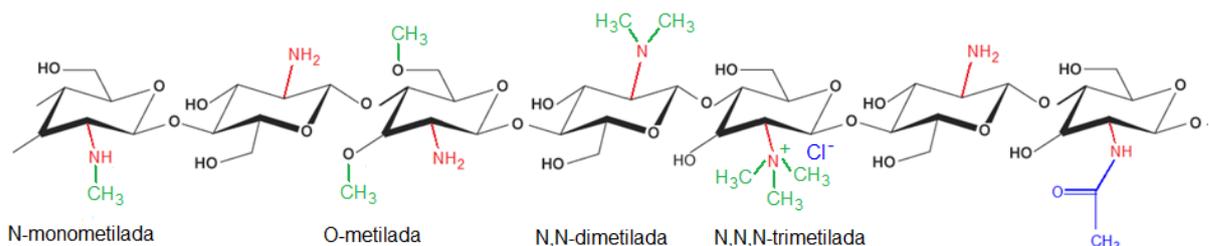
3.3.2 N,N,N-trimetilquitosana (TMQ)

Uma importante vantagem de se trabalhar com quitosana é a possibilidade de se preparar uma grande variedade de derivados. Sabe-se que, diferentes estratégias de derivatização são realizadas com o objetivo de melhorar as propriedades da quitosana (WANG et al., 2020), e uma delas é a solubilidade em água, visto que a quitosana necessita de um pH ácido ($pK_a = 6,75$) para sua dissolução que ocorre via protonação dos grupos amina. Isso gera limitações para algumas aplicações em que o meio ácido pode interferir (MACÊDO, 2022).

Segundo Bakshi et al. (2020), para aumentar a solubilidade e possibilitar a utilização da quitosana em uma faixa mais ampla de pH, vários derivados hidrossolúveis vêm sendo desenvolvidos. E diversos grupos de pesquisa relatam a obtenção de derivados hidrossolúveis por meio da modificação química, realizada principalmente nos três grupamentos funcionais nucleofílicos: amina no carbono C2 (C2- NH_2), hidroxila secundária no carbono C3 na (C3-OH) e hidroxila primária no carbono C6 (C6-OH) (MARTINS, MORGADO E DE ASSIS; 2014).

O derivado N,N,N-trimetilquitosana (TMQ) é um polieletrólito hidrossolúvel que possui cargas positivas permanentes ao longo das cadeias devido à quaternização dos grupos amina, sendo, portanto, solúvel em uma ampla faixa de pH (BRITTO E ASSIS; 2009). A sua obtenção por meio da introdução de cargas positivas permanentes nas cadeias de quitosana pode ser efetuada via adição de um substituinte contendo um grupo amônio quaternário ou pela quaternização dos grupos amina desse polímero (TAVARES, 2013), (Figura 5).

Figura 5 - Representação da reação de trimetilação da quitosana.



FONTE: O AUTOR

A primeira alternativa envolve a reação da quitosana com um epóxido de sal de amônio, tal como o cloreto de glicidiltrimetilamônio e a segunda pode ser

acompanhada pela alquilação redutiva ou pela N-alquilação direta e extensiva da quitosana com iodeto de metila (CURTI, 2004).

Estudos reportam que a introdução de substituintes ao grupamento amina no C2 para a formação de sais de amônio quaternário de quitosana solúveis em uma faixa de pH mais alto apresenta maior ação antimicrobiana em comparação às quitosana não modificadas (ABD EL-HACK et al., 2020).

Diversas pesquisas revelaram que o derivado quaternário N,N,N-trimetil quitosana (TMQ) induziu maior resposta antibacteriana contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* (cepa de bactéria resistente a drogas) (RÚNARSSON et al., 2007; BAKSHI et al., 2018; FOLLMANN et al., 2016; ZHANG et al., 2018; BRITTO E ASSIS, 2020). Isso ocorre em virtude da presença das cargas positivas permanentes na estrutura da quitosana, ou seja, os derivados frente às bactérias são superiores às da quitosana, sendo que o melhor desempenho foi atribuído aos grupos imidazóis protonados (LI et al., 2019).

3.4 NANOENCAPSULAMENTO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS

A fim de aumentar a estabilidade de compostos bioativos, tais como peptídeos, OE, compostos fenólicos, vitaminas entre outros, as técnicas de encapsulamento vêm sendo utilizadas. O encapsulamento é um processo em que a substância ativa é envolvida em um material de parede, produzindo partículas na escala nanométrica (nanoencapsulação), micrométrica (microencapsulação) ou escala milimétrica (PEREIRA, 2020).

O encapsulamento de ativos tem sido muito utilizado com a finalidade de aumentar a estabilidade das substâncias ativas evitando assim a degradação ou liberação rápida induzida por pH, temperatura, enzimas ou outros fatores. (EZHILARASI et al., 2013). Esse processo pode ser aplicado em diferentes áreas do conhecimento, como no campo dos alimentos e indústria têxtil (ASSADPOUR E MAHDI JAFARI; 2019; CHOPDE, et al., 2020), na farmacologia (FERREIRA, 2019) entre outros.

3.4.1 Nanoencapsulamento do Óleo Essencial *L. grata* / Quitosana

Os nanomateriais poliméricos têm recebido grande atenção dos pesquisadores devido às propriedades especiais que podem ser adquiridas a partir dos tamanhos

pequenos. Por exemplo, melhorar a estabilidade química, aumentar a atividade destas substâncias e reduzir a volatilização dos mesmos, melhorando seus potenciais biológicos (SILVA, 2019).

De acordo com a ASTM (2012), devem ser consideradas nanopartículas (NP) aquelas estruturas que apresentam ao menos duas dimensões na faixa entre 1 nm e 100 nm. As NP poliméricas são estruturas normalmente sólidas e esféricas que podem ser preparadas a partir de polímeros naturais ou sintéticos.

A nanoencapsulação é um processo adequado na redução da degradação de componentes instáveis, como os óleos essenciais que, em geral, possuem alta volatilidade e instabilidade química, o que gera perdas em suas atividades, dependendo do processo de preparação da formulação ou do tempo de exposição em condições adversas. Por isso, vem sendo empregado o processo de encapsulamento em NP (HOSSEINI et al., 2013), com polissacarídeos como a quitosana, que é um ótimo material para esse processo devido a sua propriedade quelante e biodegradabilidade (BRITTO et al., 2014).

Os OE são instáveis e susceptíveis à degradação na presença de oxigênio, luz e temperatura, sendo o encapsulamento em sistemas coloidais uma alternativa para preservá-los por tempo maior e sob condições ambientais mais desfavoráveis (SHERRY et al., 2013). O encapsulamento é feito com base em carreadores, que são estruturas que permitem melhorar a biodisponibilidade de muitos compostos bioativos, sendo divididos em duas classes: as formulações poliméricas de nanoparticulados, que promovem melhora significativa da atividade antimicrobiana do óleo essencial; e os transportadores lipídicos, incluindo os lipossomas, NP lipídicas sólidas, partículas lipídicas nanoestruturadas e nano e microemulsões (BILIA et al., 2014).

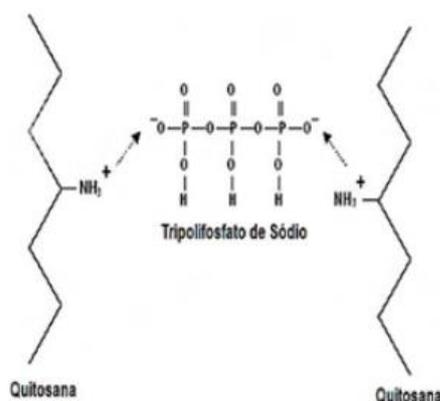
O nanoencapsulamento representa uma estratégia promissora para superar as limitações dos óleos essenciais, aumentando a estabilidade química na presença de ar, luz, umidade e temperaturas elevadas. Além disso, os nanocarreadores garantem manuseio mais prático e seguro do composto (BILIA et al., 2014).

As técnicas de produção de partículas usando quitosana incluem: geleificação iônica, spray drying, separação por emulsão de fase, coacervação simples e complexa, recobrimento com solução coating (SCHALCH, 2019). A quitosana possui uma propriedade muito interessante que é a capacidade de geleificação em contato

com poliânions específicos. Tal processo se deve à formação de reticulação inter e intramolecular mediada por esses poliânions (KUMAR, 2000).

As NP de quitosana podem ser obtidas por gelificação iônica com tripolifosfato de sódio (TPP) (BRITTO et al., 2014), em que o TPP atua como um contra-íon provocando a coagulação da mistura pela formação de ligações intra e intermoleculares entre os fosfatos negativamente carregados do TPP e os grupos amino positivamente carregados da quitosana (Figura 6). Estudos anteriores mostram que a produção de nanopartículas de quitosana e TPP utilizando quitosana de baixa massa molecular com alto grau de desacetilação e os resultados indicaram que o tamanho das partículas aumentaram com a elevação da concentração de quitosana ou TPP (FAN et al., 2012).

Figura 6 - Modelo de geleificação da quitosana e TPP por interação entre grupos iônicos e catiônicos.



FONTE: SCHALCH (2019).

3.5 USO DE DETERGENTES SANITIZANTES

Segundo ANVISA (2007), detergente é um produto destinado à limpeza de superfícies e tecidos por meio da diminuição da tensão superficial. A grande maioria dos detergentes não possui ação de desinfecção ou sanitização. Porém, uma alteração em sua composição química, como a introdução de princípios ativos, pode proporcionar uma funcionalidade diferente (GOMES, 2020), como de uma detergente-sanitizante, que são substâncias ou preparações destinadas à aplicação em objetos, tecidos, superfícies inanimadas e ambientes, com a finalidade de limpeza,

desinfecção, esterilização, sanitização, desodorização, odorização, desinfestação, desinfecção (ANVISA, 2016).

Os detergentes-sanitizantes podem ser classificados como físicos ou químicos e possuem vários mecanismos de ação, como: alteração da pressão osmótica, lesão irreversível na estrutura celular, bloqueio da membrana, coagulação das proteínas celulares e dissolução de substâncias celulares dos micro-organismos (INÁCIO, 2022). Porém, a ação dos sanitizantes depende de muitas variáveis, a concentração, o pH, o tipo de microorganismo e características de superfície, são fatores que alteram a qualidade da sanitização (GERMANO E GERMANO, 2014).

Os detergentes sanitizantes é uma das principais estratégias utilizadas no controle e na higienização de microrganismo produtores de biofilmes, pois são capazes de aderir e multiplicar na superfície de diversos utensílios industriais que estão em contatos com alimentos, como o vidro e o aço inoxidável (RECH et al., 2015; GOMES et al.,2018). A expressão biofilme foi criada para descrever a microbiana sésil, ou seja, microrganismos que estão aderidos a superfícies decorrentes da formação de substâncias poliméricas extracelulares, produzindo uma rede gelatinosa que paralisa e preservam as células (FABIANO; AGUERA; DO PRADO, 2020).

Os detergentes sanitizantes são produtos utilizados no procedimento de limpeza capaz de romper ou dissolver a matriz dos biofilmes, de modo que os sanitizantes consigam reduzir os microrganismos deteriorantes e eliminar os patógenos a níveis seguros (FORSYTHE, 2013).

Entre os microorganismos que são formadores de biofilmes, estão as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. fragi*, *Micrococcus sp.*, *B. cereus*, *Enterococcus sp.*, *L. monocytogenes*, *P. fluorescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella sp.*, *E. coli*. e *Aeromonas hydrophila* (MILLEZI, 2009). Na literatura existem pesquisas sobre o uso de detergente sanitizante para a higienização de superfícies, como a de Fabiano; Aguera; Do Prado (2020), que estudaram a eficiência de detergente sanitizante e alcalino para remoção de biofilmes de cepa padrão de *E. coli* em superfície de aço inoxidável. Millezi (2009), também examinou a ação bactericida de detergente sanificante à base de óleos essenciais sobre biofilme de *Aeromonas hydrophila*.

O desenvolvimento e formulação dos detergentes sanitizantes deve levar em conta alguns fatores, como pH, estabilidade e a formação de espuma. O pH (potencial hidrogeniônico) é uma grandeza físico-química, que representa uma transformação

logarítmica negativa da concentração de hidrogênio ou hidroxila, em um meio qualquer (TRENTIN, 2016). De acordo com Resolução Normativa nº 1/78 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA,2007) o pH do detergente deve ser de no mínimo 5,5 e o máximo de 8,5; sendo o ideal próximo do pH 7 que é o neutro.

A espuma de um detergente é um aspecto analisado pelo consumidor doméstico, pois segundo SILVA, DUTRA e CADIMA (2016) existe a cultura, errônea, que diz respeito que quanto mais espuma, melhor é um produto. O responsável pela formação da espuma num detergente está relacionado com a adição de lauril sulfeto de sódio, um princípio ativo destinado, unicamente, à geração de espuma (THEVES, 2017). Quanto mais lauril for adicionado num produto, mais espuma o mesmo irá gerar. Porém, a espuma não influencia na ação do poder do detergente sendo apenas um vetor ótico para a identificação de manipulação do produto e, em alguns casos, para facilitar (reduzindo o atrito) a ação mecânica (THEVES, 2017).

3.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR – ATR)

A espectroscopia infravermelha de transformada de Fourier atenuada de refletância total (FTIR – ATR) é uma ferramenta versátil para o estudo das superfícies de nanomateriais que podem ser usadas de maneira qualitativa ou quantitativa. Sendo uma técnica capaz de caracterização a interface líquido-sólido para sondar a adsorção de superfície em superfícies de nanopartículas (MUDUNKOTUWA, AL MINSHID E GRASSIAN; 2014).

3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é um equipamento versátil e uma técnica muito utilizado, que permite a observação morfológica, atuando na análise das características microestruturais de materiais sólidos e obtenção de informações estruturais e químicas de amostras diversas (AMADUCI, 2007).

O primeiro microscópio eletrônico de varredura foi construído em 1932 por Ardenne, partindo da ideia inicial de Knoll, possuía duas lentes magnéticas que focalizavam o feixe eletrônico. Seu princípio consiste em utilizar um feixe de elétrons extremamente estreito para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica com varredura

perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente, o feixe é acelerado pela alta tensão criada entre o filamento e o ânodo (NASCIMENTO, 2018).

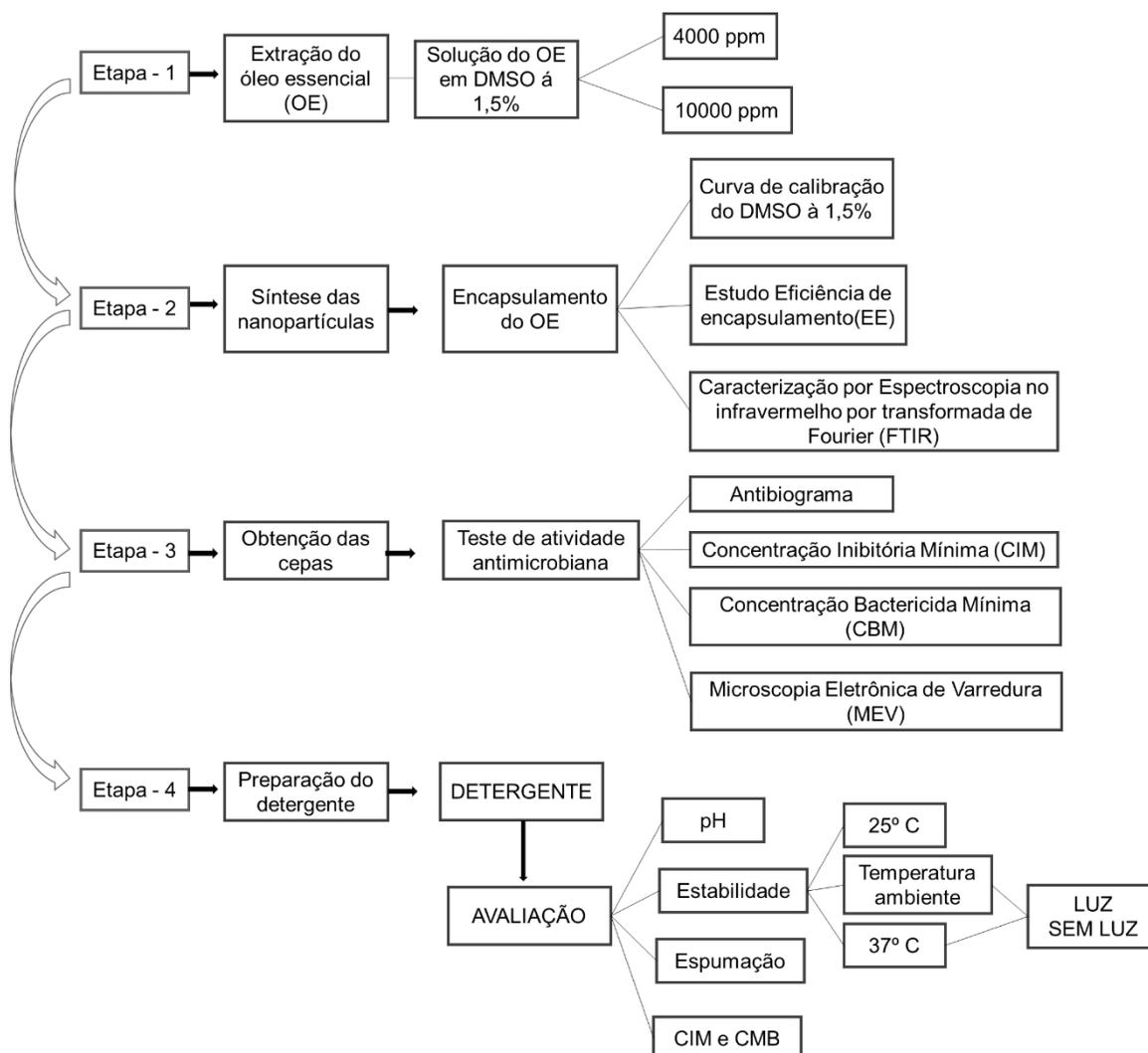
O resultado da interação entre o feixe de elétrons incidente e a superfície da amostra é a produção de elétrons secundários e/ou elétrons retroespalhados que são acelerados por um detector e seus sinais amplificados, gerando imagens da topografia da amostra (DEDAVID, GOMES E MACHADO, 2007).

Na área biologia a MEV, vem sendo utilizada para analisar a morfológica, a avaliação da ação antimicrobiana após a interação de um novo material polímero, impregnado com nanopartículas (HADDAD et al., 1998). Por meio desta técnica de microscopia pode-se comprovar a sua eficácia apresentando a inibição do crescimento nas colônias bacteriana (SEGALA et al., 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Semiárido, Petrolina – PE, seguindo as etapas descritas no fluxograma 1. A quitosana (massa molar média e 82% de pureza) e o tripolifosfato de sódio foram adquiridos da Aldrich Chemical Company Inc. (EUA) e foram utilizados de acordo com as recomendações do fabricante. O Agar Mueller Hinton (Himedea), o caldo de Mueller Hinton (Kasvi), Brain Heart Infusion (Kasvi) e a base para a formulação do detergente (Kalim) também foram processados de acordo com os fabricantes. A N,N,N-trimetilquitosasa (TMQ) foi gentilmente cedido pelo Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio da Embrapa Instrumentação São Carlos – SP, e foi sintetizada de acordo com Britto e Assis (2007).

Fluxograma 1 – Descrição das etapas realizadas.



FONTE: O AUTOR.

4.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *L. grata*

O óleo essencial foi extraído das folhas de *L. grata*, colhidas no período da manhã do campo experimental da Caatinga da Embrapa Semiárido, em Petrolina – PE, no primeiro trimestre do ano de 2018. As folhas foram secas em estufa (30°C) e uma massa de 100 g foi submetida à extração do OE por hidrodestilação em aparelho Clevenger.

4.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS E ENCAPSULAMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia grata*

As NP foram preparadas com dois tipos de polímeros: a quitosana comercial (QUI) e um de seus derivados, a N,N,N-trimetilquitosana (TMQ). Em ambos os polímeros as sínteses das NP foram inicialmente obtidas em sua forma pura. Para isto, 50 mL de uma solução de tripolifosfato de sódio (TPP) a 1,6 mg mL⁻¹ em meio aquoso, foi adicionado a uma taxa de 1 mL min⁻¹ em uma solução de 50 mL de quitosana à 3 mg mL⁻¹, dissolvida em ácido acético 0,5%. Entretanto, para síntese de NP utilizando a TMQ foram adicionados 25 mL de TPP, nas mesmas condições, tendo como volume final 75 mL. As NP puras (NP) foram isoladas por centrifugação (Centrífuga Eppendorf modelo 5420, 20817 RCF, 20 minutos a 4°C).

O encapsulamento do OE ocorreu em duas etapas. Inicialmente as NP foram ressuspensa em 2,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) a 1,5% com auxílio de banho ultrassônico durante 80 minutos (3 ciclos de 20 minutos, com tempo de descanso de 10 minutos entre eles). Separadamente, foi preparada 2,5 mL de solução de OE em DMSO 1,5% e colocada para interagir em seguida com 2,5 mL da suspensão de NP, perfazendo assim, 5 mL de volume final. A concentração final do OE foi uma suspensão de 4.000 ou 10.000 ppm. As NP encapsuladas foram denominadas NP-OE.

Das suspensões preparadas foram reservados 4 mL para os testes de atividade microbiana (CIM, CBM e antibiograma) frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, enquanto 1 mL foi quantificado no Espectrofotômetro UV-visível (Thermo Fisher Scientific, MultiSkan GO, Vantaa, Finlândia), na faixa de 200 a 400 nm, a fim de determinar a concentração e a eficiência de encapsulamento (EE) por meio da equação 1.

$$EE = \left(\frac{\text{Concentração final}}{\text{concentração inicial}} * 100 \right) - 100 \quad (1)$$

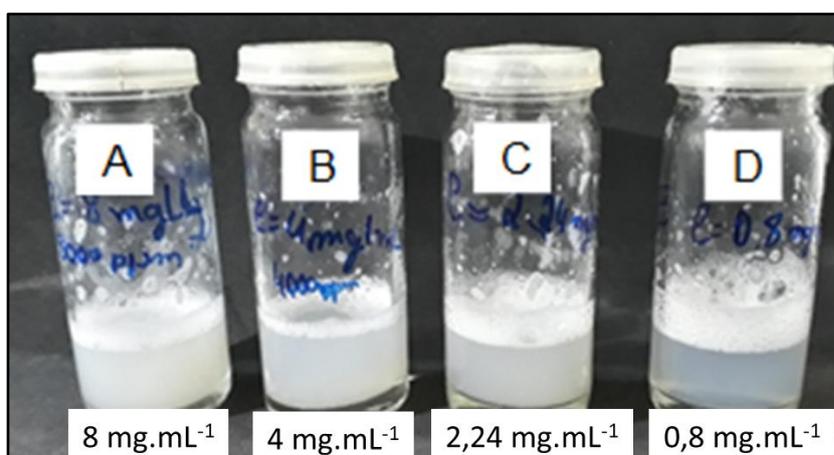
4.2.1 Curva de calibração do OE em DMSO 1,5%

Para determinar a curva de calibração do OE de *L. grata* no solvente DMSO a 1,5%, foi preparada uma solução estoque de OE contendo 80 mg em 100 mL de DMSO 1,5% e retiradas alíquotas de 0,2; 0,4; 0,5; 1,0 e 1,2 mL e diluídas para 10 mL. Em seguida, a curva de calibração foi levantada, quantificando no espectrofotômetro UV-visível (Thermo Fisher Scientific, MultiSkan GO, Vantaa, Finlândia) na faixa de 200 a 400 nm e os dados analisados na plataforma do Origin9®.

4.2.2 Estudo da Eficiência de encapsulamento (EE)

As NP, preparadas anteriormente, foram colocadas para interagir com soluções de OE em 4 concentrações diferentes (8; 4; 2,24 e 0,8 mg mL⁻¹) com auxílio de banho ultrassônico durante 80 minutos (3 ciclos de 20 minutos, com tempo de descanso de 10 minutos entre eles). Estas soluções com princípios ativos foram preparadas a partir de diluição de solução estoque usando o DMSO à 1,5%. Após a interação, a suspensão de NP-EO foi centrifugada e o sobrenadante quantificado em espectrofotômetro UV-Visível (Thermo Fisher Scientific, MultiSkan GO, Vantaa, Finlândia), na faixa de 200 a 400 nm (Figura 7).

Figura 7 - Aspecto da suspensão de nanopartícula com óleo essencial (NP-OE) em diferentes concentrações.



A - 8 mg mL⁻¹; B - 4 mg mL⁻¹; C - 2,24 mg mL⁻¹ e D - 0,8 mg mL⁻¹

FONTE: O AUTOR

4.3 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

As nanopartículas puras de quitosana e TMQ (NP_{QUI} e NP_{TMQ}) e encapsulados com OE de *L. grata* (NP-OE_{QUI} e NP-OE_{TMQ}), preparadas segundo o método do item 4.2, colocadas placa de Petri, congeladas e liofilizadas por 24 h (Liofilizador de Bancada L101). Enquanto as soluções de quitosana e TMQ (3 mg.mL⁻¹) foram feitas pela técnica de *casting*, que consiste na desidratação da solução filmogênica, em que 20 mL de cada amostra foram colocadas em uma placa de Petri, e após evaporação os filmes foram destacados e caracterizadas utilizando o equipamento IRTracer 100 da marca Shimadzu com dispositivo de Reflectância Total Atenuada (ATR).

4.4 OBTENÇÃO DAS CEPAS DAS BACTÉRIAS

As cepas bacterianas foram obtidas de uma coleção de cultura padrão (ATCC - American Type Culture Collection) gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Petrolina, PE. As cepas utilizadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

As cepas bacterianas foram recebidas liofilizadas e mantidas a -20°C até sua utilização. Para ativação das cepas, as mesmas, foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo de Brain Heart Infusion (BHI) e colocadas em estufa incubadora do tipo B.O.D. (Marca: QUIMIS) a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação foram semeadas em placas de Petri contendo BHI sólido com 2% de ágar e incubadas novamente na B.O.D a 37°C por 24hs. Esse procedimento foi repetido duas vezes para verificar a pureza da bactéria.

4.5 TESTE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando os testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e de Sensibilidade a antimicrobianos (antibiograma), para os seguintes materiais: NP puras de quitosana e TMQ (NP_{QUI} e NP_{TMQ}); NP encapsuladas com OE de *L. grata* (NP-OE_{QUI} e NP-OE_{TMQ}), solução de quitosana e solução de TMQ em concentrações diferentes como descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Representação esquemática das amostras, concentrações e análise utilizadas (antibiograma, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima) para os testes da atividade antimicrobiana.

Amostra	Concentração	Análise			
		Antibiograma	CIM	CBM	MEV
OE	Puro	X			
	4.000 mg.mL ⁻¹	X	X	X	X
	10.000 mg.mL ⁻¹	X			
	Puro dil. 10X	X			
	Puro dil. 100X	X			
	Puro dil. 1.000X	X			
NP _{QUI}		X	X	X	
NP _{TMQ}		X	X	X	
NP-OE _{QUI}	4.000 mg.mL ⁻¹	X	X	X	X
	10.000 mg.mL ⁻¹	X			
NP-OE _{TMQ}	4.000 mg.mL ⁻¹	X	X	X	
	10.000 mg.mL ⁻¹	X			
QUI	4.000 mg.mL ⁻¹	X	X	X	
	10.000 mg.mL ⁻¹	X			
TMQ	4.000 mg.mL ⁻¹	X	X	X	
	10.000 mg.mL ⁻¹	X			
DTG*			X	X	
DTG + OE*	2.000 mg.mL ⁻¹		X	X	
DTG + NP-OE _{QUI} *	2.000 mg.mL ⁻¹		X	X	
DTG + NP-OE _{TMQ} *	2.000 mg.mL ⁻¹		X	X	

OE = Óleo essencial de *L. grata*; NP_{QUI} = Nanopartícula pura obtidas com quitosana; NP_{TMQ} = Nanopartículas puras obtidas com trimetilquitosana; NP-OE_{QUI} = Nanopartículas de quitosana com óleo essencial; NP-OE_{TMQ} = Nanopartículas de trimetilquitosana com óleo essencial; QUI = Solução de quitosana; TMQ = Solução de trimetilquitosana; DTG = Detergente

*Metodologia de preparo descrita no 4.5

FONTE: O AUTOR

Os procedimentos de CIM e CBM foram realizados utilizando a técnica de microdiluição em caldo, segundo a metodologia estabelecida pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (CLSI. M07-A9, 2012). O antibiograma foi realizado de acordo com a técnica de Kirby e Bauer.

4.6.2 Teste de sensibilidade a antimicrobianos (antibiograma)

4.6.2.2 Preparo dos discos antimicrobianos

Discos de papel filtro com diâmetro de 5 mm foram cortados e esterilizados. Sobre esses discos foram depositados 7 μL dos antimicrobianos testados, Tabela 1, o OE puro e diluído (3 diluições com DMSO a 1,5% $D_1 = 10x$; $D_2 = 100x$ e $D_3 = 1000x$ v/v); NP-OE_{QUI} e NP-OE_{TMQ} em duas concentrações iniciais de OE na suspensão de NP (4.000 e 10.000 ppm); quitosana (4.000 e 10.000 mg.mL^{-1} em ácido acético 0,5%) e TMQ (4.000 e 10.000 mg.mL^{-1} em água). Para o controle positivo foi utilizado a amoxicilina (10 μg) e DMSO à 1,5% para o controle negativo.

4.6.2.3 Teste de antibiograma

Para esse procedimento, utilizou-se colônias de cultivo recente das cepas bacterianas utilizadas, suspensas em solução salina de NaCl a 0,85% até se obter uma turvação compatível com a escala 0,5 de Mac Farland (a $1,5 \times 10^8$ bactérias por mL aproximadamente). Em seguida, com auxílio de um swab estéril, cada suspensão bacteriana foi semeada em placas de Petri estéril G (90x15 mm) contendo ágar MH de forma a abranger toda a superfície.

Em seguida, com auxílio de uma pinça flambada e resfriada, os discos (preparados previamente) foram colocados sob a superfície do meio, exercendo uma leve pressão com a ponta da pinça para uma boa adesão dos discos. As placas com os discos foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

Após o período de incubação, foi analisado o padrão de crescimento ou inibição ao redor de cada disco. Para medir o diâmetro de cada halo de inibição de cada disco foi utilizado um paquímetro.

4.6.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Todos os poços da placa de microdiluição foram inicialmente preenchidos com 100 μL de caldo de cultivo MH. Em seguida, 100 μL de cada solução teste, de acordo com a Tabela 1 (OE, NP_{QUI}, NP_{TMQ}, NP-OE_{QUI}, NP-OE_{TMQ}, solução de quitosana (4 mg.mL^{-1} em ácido acético 0,5%) (QUI), solução de TMQ (4 mg.mL^{-1} em água destilada) e as formulações de detergente) foram adicionados em oito poços da primeira linha da placa (A1, A2, A3, A7, A8 e A9). Com isto, a concentração do princípio ativo foi reduzida à metade, ficando em 2000 mg.mL^{-1} . Após a

homogeneização com micropipeta, 100 μL da linha A foi transferida para a linha B resultando em uma concentração de $1000 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e sucessivamente até a linha H.

Em seguida, nas colunas 4 e 10, foi realizado o controle para confirmação do crescimento bacteriano na presença do solvente, adicionados 100 μL de DMSO à 1,5%, solvente utilizado no preparo das NP-OE e diluição do OE, com exceção das placas contendo QUI, que o solvente foi ácido acético 0,5%, e TMQ que se utilizou água destilada. Nas colunas 5 e 11, foram utilizadas como controle positivo de crescimento contendo o caldo de cultura e o inóculo bacteriano, e nas colunas 6 e 12 o controle negativo, somente com o caldo de MH (Figura 8).

Em todos os poços, exceto os das colunas 6 e 12, foram adicionados 10 μL de inóculo de cada cepa bacteriana padronizada pela escala de McFarland 0,5 que estima uma concentração de $1,5 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$. As placas de microdiluição tampadas e incubadas a 37°C por 24 horas.

Após esse período foi realizada a avaliação visual do crescimento microbiano e para que isso ocorresse, foi adicionado 20 μL do corante 2,3,5-trifenilcloro (CTT $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em todos os poços da microplaca. Esse corante indica a presença da atividade metabólica bacteriana, quando ocorre a mudança de cor do amarelo para o roxo, isso ocorre devido a presença de enzimas desidrogenases na membrana citoplasmática que reduzem o sal de CTT formando cristais de coloração roxa (Figura 8).

4.5.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CIM)

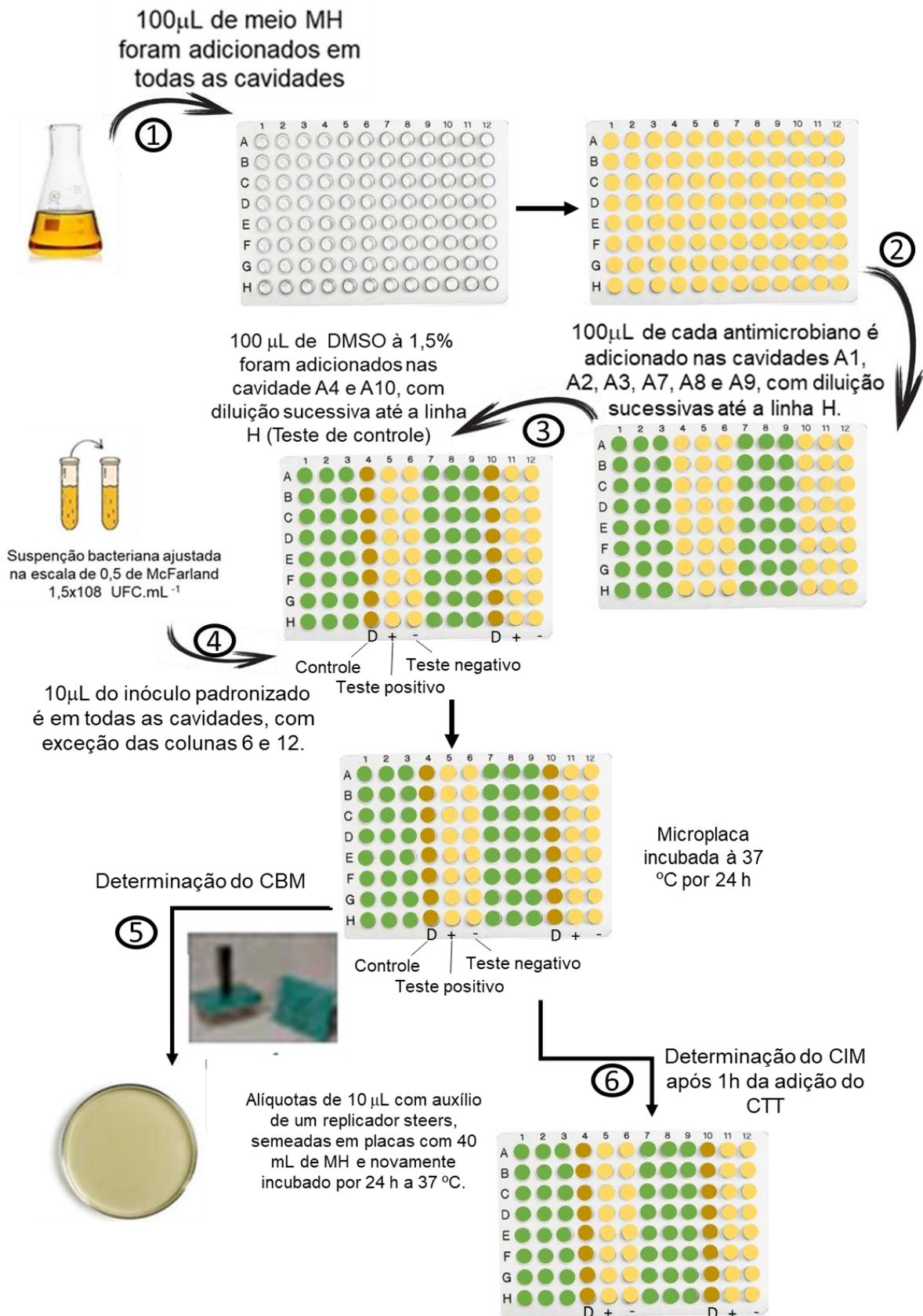
Após 24h de incubação da microplaca, foi retirada uma alíquota de 10 μL com auxílio de um replicador steers e semeada em placa de Petri com 40 mL de ágar MH e novamente incubando por 24 h a 37°C , para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), que corresponde à menor quantidade do extrato capaz de matar cepas de *S. aureus* e *E. coli* (Figura 8, etapa 5).

4.5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi usada para explorar os efeitos do OE e das NP- OE_{QUI} na morfologia das cepas de *S. aureus* e *E. coli* de acordo com o método descrito por Zhang et al. (2018), com modificações.

As cepas bacterianas foram incubadas em meio MH caldo a 37°C, em seguida centrifugado (Centrífuga Eppendorf modelo 5420, 3000 rpm, 5 minutos a 4°C). Posteriormente, adicionado 1,0 mL dos tratamentos (OE bruto e NP-OE_{QUI}) (Tabela 1). Todas as amostras foram incubadas a 37°C por 10 h e após incubação, as suspensões foram centrifugadas novamente e lavadas três vezes com solução tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹. As células bacterianas foram fixadas em 2,5 % glutaraldeído por 10 h a 4°C. As amostras foram desidratadas em uma série de etanol graduado (30%, 50%, 70%, 85%, 90% e 100%), e então depositadas em placas e colocadas para secar. Completamente secas, todas as amostras foram revestidas com ouro em um revestidor de íons por 2 min e analisadas usando um microscópio eletrônico de varredura da marca Tescan, Vega 3.

Figura 8 - Esquema representativo do procedimento dos testes de CIM e CBM.

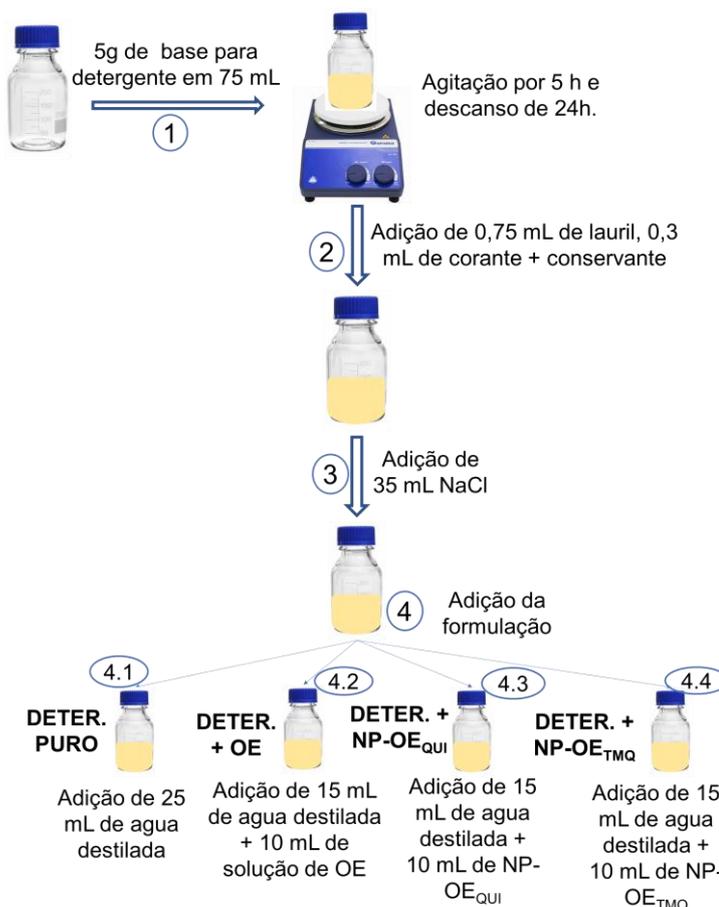


FONTE: O AUTOR

4.6 TESTES DA FORMULAÇÃO SANITIZANTE

Para o preparo das quatro formulações do detergente sanitizante utilizou-se uma base comercial da KALIM Produtos de Limpeza, o método de preparo foi realizado segundo a descrição do fabricante, o qual é dividido em quatro etapas (Figura 9). A primeira iniciou-se pesando uma massa de 5 g da base para o detergente, a qual foi dissolvida em água destilada em $\frac{3}{4}$ do volume final (100 mL), deixada em agitação por cinco horas e colocada para descansar durante 24 h (Figura 9 – etapa 1). Em seguida, foi adicionado 750 μL do lauril e 300 μL do corante + conservante e colocado sob agitação por 5 minutos (Figura 9 - etapa 2). Posteriormente, foi acrescentado lentamente 35 mL de NaCl a 0,2125 g.L⁻¹ a fim de tornar o detergente mais viscoso (Figura 9 - etapa 3). E por fim, a formulação foi incorporada ao detergente preparado (Figura 9 - etapa 4). Para isso, em cada amostra foi adicionado o restante do volume ($\frac{1}{4}$ de 100 mL ou 25 mL), em que para o detergente puro (DTG) foram adicionados 25 mL de água destilada (etapa 4.1); para o detergente com OE (DTG + OE) foram adicionados 10 mL da solução do OE a 2.000 ppm + 15 mL de água destilada (etapa 4.2); para o detergente com NP-OE_{QUI} e NP-OE_{TMQ} (DTG + NP-OE_{QUI} e DTG + NP-OE_{TMQ}) foram adicionados 10 mL da suspensão de nanopartículas com OE encapsulado a 2000 ppm + 15 mL de água destilada (etapas 4.3 e 4.4). Por fim, em todas as formulações foi adicionado 750 μL do espessante.

Figura 9 – Detalhamento do procedimento do preparo do detergente sanitizante.



FONTE: O AUTOR

4.6.1 Caracterizações físico-químicas

4.6.1.1 Potencial Hidrogeniônico (pH)

Nesta análise, utilizou-se um pHmetro portátil da MS TECNOPON Instrumentação. O pHmetro foi calibrado em pH 4 e 7 com soluções padrões antes das análises.

4.6.1.2 Espumação

Para determinar a espumação das amostras de detergente preparadas anteriormente seguiu o método descrito por Theves (2017), com modificações, em que se preparou uma solução de 1% de detergente em água. Em seguida transferiu-se essa solução para uma bureta de 50 mL. Colocou-se uma proveta de 100 mL abaixo da bureta. Elevou a bureta a uma determinada altura (6 mm), abriu o registro de saída, e deixou sair 40 mL da solução e depois mediu a altura da espuma formada. Esse teste foi feito em triplicata.

4.6.1.3 Estabilidade

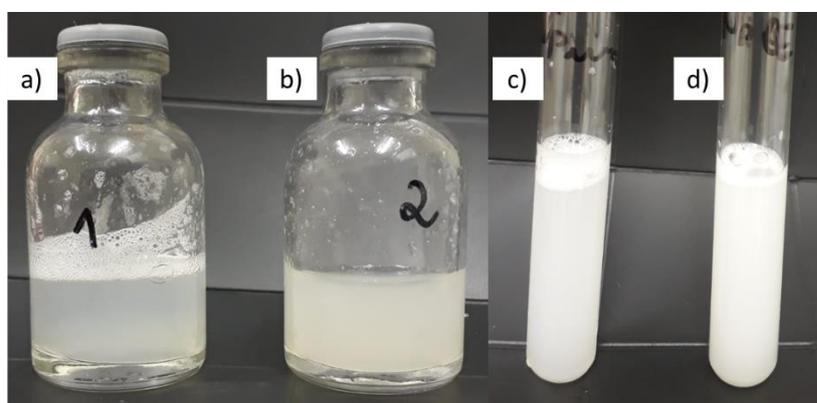
Para o teste de estabilidade, as amostras de detergente foram submetidas a condições de temperaturas diferentes (sob refrigeração em geladeira a 21°C, em temperatura ambiente e a 37°C) e presença ou ausência de luz durante 6 dias. Avaliada no tempo 0, 1, 2, 4 e 6 dias no Espectrofotômetro UV-visível (Thermo Fisher Scientific, MultiSkan GO, Vantaa, Finlândia), na faixa de 200 a 800 nm. Além de registros fotográficos a fim de acompanhar a formação de fases durante o período de avaliação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

As sínteses preparadas com DMSO 1,5% apresentaram suspensão de aspecto homogêneo, não formando precipitado. Nas concentrações utilizadas de 4.000 e 10.000 ppm, o OE foi completamente encapsulado nas NP_{QUI}, as quais ficaram bem dispersas (Figura 10). Esta boa dispersão indica a ocorrência de um sistema estável para as NP-OE_{QUI}.

Figura 10 - Aspecto das suspensões de NP em DMSO 1,5% a partir dos diferentes materiais.



a- quitosana (NP_{QUI}); b- quitosana encapsulada (NP-OE_{QUI}); c- N,N,N-trimetilquitosana (NP_{TMQ}) e d- N,N,N-trimetilquitosana encapsulada (NP-OE_{TMQ}).

FONTE: O AUTOR

De acordo com os dados obtidos (Tabela 2), o sistema composto por NP_{TMQ} apresentou eficiência de encapsulamento superior para o OE de *L. grata*. Embora a diferença de eficiência de encapsulamento (EE) entre NP-OE_{QUI} e NP-OE_{TMQ} seja de 5%, observa-se que resultados semelhantes são reportados na literatura (Liu et al. 2008), os quais avaliaram o processo de síntese através da incorporação de princípios ativos em NP de polissacarídeos. Assim, foi verificado que a eficiência de encapsulamento foi de até 95% alcançada em derivados de quitosana solúvel em água.

Tabela 2 – Eficiência de Encapsulamento (EE) para nanopartículas de quitosana (NP-OE_{QUI}) e trimetilquitosana (NP-OE_{TMQ}) encapsuladas com OE de *Lippia grata*.

Amostra	C _{final} (mg mL ⁻¹)	EE (%)
NP-OE _{QUI}	1,8	77,1±1,2
NP-OE _{TMQ}	1,4	82,0±0,8

FONTES: O AUTOR

Outro fato relevante em relação ao EE, foi que para as amostras de concentração inicial maiores de OE (8,0; 4,0 e 2,24 mg.mL⁻¹) o valor de EE não dependeu da concentração inicial, ficando em torno de 60%-75% (Tabela 3). Por outro lado, para a concentração inicial mais baixa (0,8 mg.mL⁻¹) de óleo essencial (OE), o valor de EE foi significativamente menor. Assim, a concentração ideal inicial de OE para o sistema NP_{QUI} deve ser torno de 8,0 mg.mL⁻¹.

Tabela 3 - Variação das concentrações inicial (C_i) e final (C_f) e da Eficiência de Encapsulamento (EE) para suspensões de nanopartículas (NP-OE_{QUI}) encapsuladas com OE de *L. grata* em meio DMSO 1,5%.

C _{inicial} (mg mL ⁻¹)	C _{final} (mg mL ⁻¹)	EE (%)
8,0	2,0	75,5
4,0	1,5	61,8
2,24	0,64	71,4
0,8	0,5	42,9

FONTES: O AUTOR

O estudo da eficiência de encapsulamento das nanopartículas de OE de *L. grata* foi realizado com DMSO à 1,5%, um solvente ainda não testado para esse tipo de síntese, porém é um composto bastante simples que tem despertado grande interesse, por conseguir dissolver agentes terapêuticos e tóxicos que não são solúveis em água (YU et al., 2010).

Esse solvente mostrou-se eficiente, já que manteve o valor da EE muito semelhante a resultados encontrados por Pereira, Duarte e Britto, (2018) e Rodrigues et al. (2018), que apresentavam várias maneiras de sintetizar nanopartículas de OE de *L. grata* com preparação de polissacarídeos e princípios ativos antifúngicos a partir

de recursos vegetais do Semiárido para revestimento de frutas utilizando diferentes tipos de solventes (benzeno, água e etanol à 50%) e de concentrações.

5.2 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Na análise de FTIR, foi observado bandas típicas de quitosana e TMQ (Tabela 4 e Figura 11), principalmente a banda 'A', referente a sobreposição da deformação axial de OH e NH em 3450 cm^{-1} e banda 'B' em 2930 cm^{-1} , referente a deformação axial de CH. Em 1640 cm^{-1} observa-se a banda 'C' referente à deformação axial de C=O (amida I), sendo esta banda característica dos resíduos acetamido presentes na quitosana e TMQ. Em 1550 cm^{-1} observa-se outra banda, 'D', característica de quitosana, a qual é referente à deformação angular de N-H. Esta banda encontra-se decrescida no espectro de TMQ, pois no derivado quaternário os grupos N-H são substituídos por $-\text{CH}_3$.

TABELA 4 – Principais bandas de absorção da quitosana, TMQ, NP-OE_{QUI}, NP-OE_{TMQ}, NP_{QUI} e NP_{TMQ}

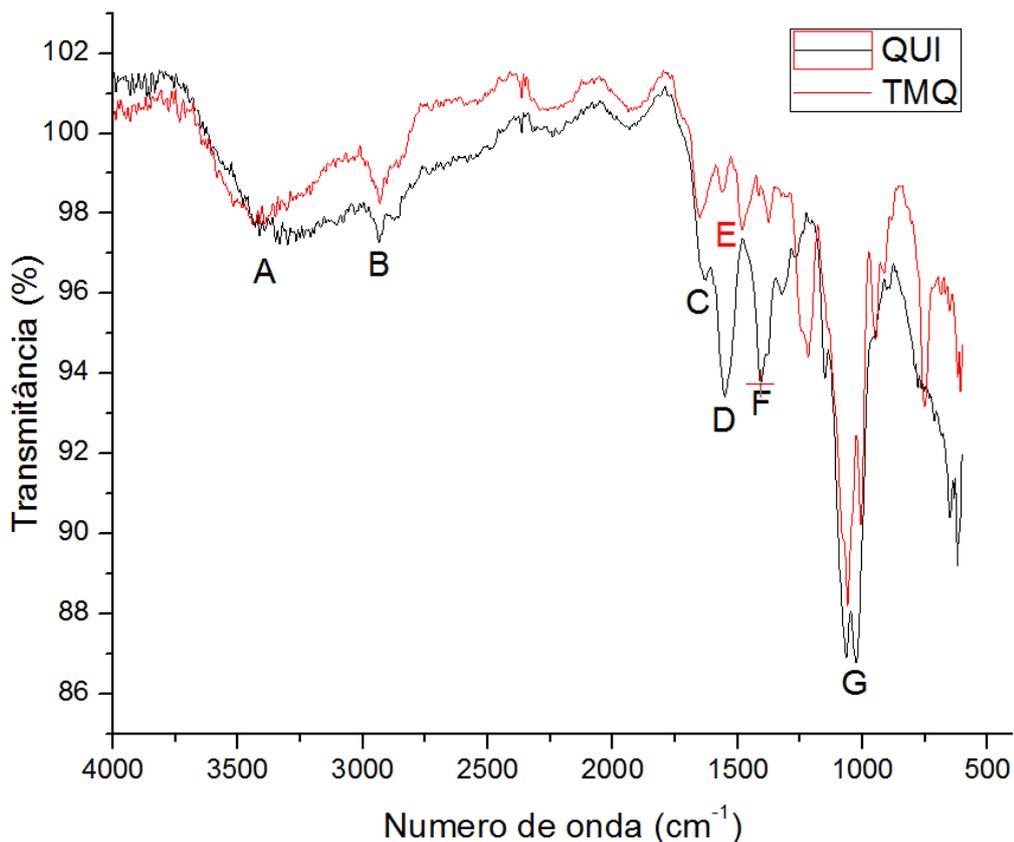
Número de onda (cm^{-1})	Atribuições	Referências
3450	deformação axial de OH e NH	BRITTO et al., 2012
2930	deformação axial de CH	BRITTO et al., 2012
1640	deformação axial de C=O	BRITTO et al., 2012
1550	deformação angular de N-H	BRITTO et al., 2012
1480	deformação angular assimétrica dos grupos metila.	BRITTO et al., 2012
1410	deformação axial de C – N	BRITTO et al., 2012
1060 e 1020	deformação axial de C-O-C	BRITTO et al., 2012
1210	deformação axial de P=O	BRITTO et al., 2012
1070 e 1020	deformação axial de P-OH	BRITTO et al., 2012
890	deformação angular de P-O	BRITTO et al., 2012

FONTE: O AUTOR

Consequentemente, estes grupos $-\text{CH}_3$ aparecem de forma intensa somente no espectro da TMQ em 1480 cm^{-1} , banda 'E', sendo referente à deformação angular assimétrica dos grupos metila introduzidos devido a reação de N-alkilação (BRITTO

et al., 2012). Outras bandas importantes no espectro da quitosana e TMQ são encontradas em 1410 cm^{-1} , 'F', e em $1060, 1020\text{ cm}^{-1}$, 'G', sendo referentes respectivamente à deformação axial de C-N e deformação axial de C-O-C.

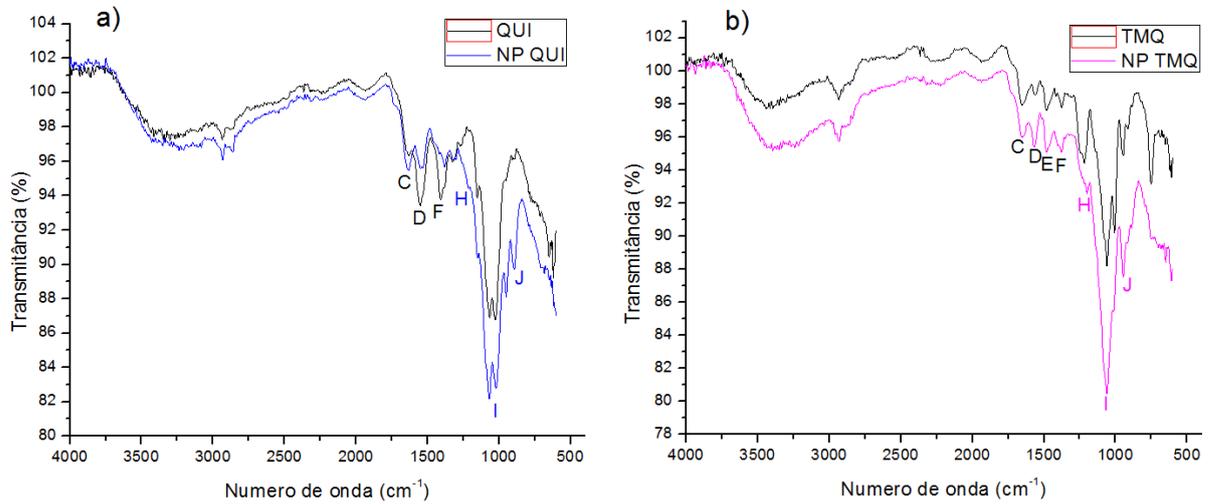
Figura 11 - Espectros de FTIR da quitosana e do derivado trimetilquitosana (TMQ), destacando as principais bandas características de absorção.



FORNE: A AUTOR.

Após a síntese das nanopartículas foi possível observar algumas mudanças nos espectros de NP_{QUI} e NP_{TMQ} (Figura 12 a, b). A primeira evidência ocorreu na intensidade das bandas 'C', 'D' e 'F', descritas acima, que diminuíram de intensidade no espectro de NP em comparação com espectros de quitosana e TMQ. Isto evidencia o entrecruzamento existente entre os grupos fosfatos e nitrogênio quaternário da quitosana (BRITTO et al., 2012). A segunda evidência da formação de nanopartículas é a existência de bandas referentes aos íons fosfatos, as quais estão presentes somente nos espectros de NP_{QUI} e NP_{TMQ} . Estas bandas são: a) deformação axial de P=O em grupos éster de fosfatos em 1210 cm^{-1} , 'H'; b) deformação axial de P-OH que aparece sobreposta à deformação de C-O-C em $1070, 1020\text{ cm}^{-1}$, 'I' e c) deformação angular de P-O em 890 cm^{-1} , 'J'.

Figura 12 - Espectros de FTIR para amostras de nanopartículas sintetizadas a partir de quitosana, NP_{QUI}, e do derivado trimetilado, NP_{TMQ}, em comparação com os respectivos espectros originais.

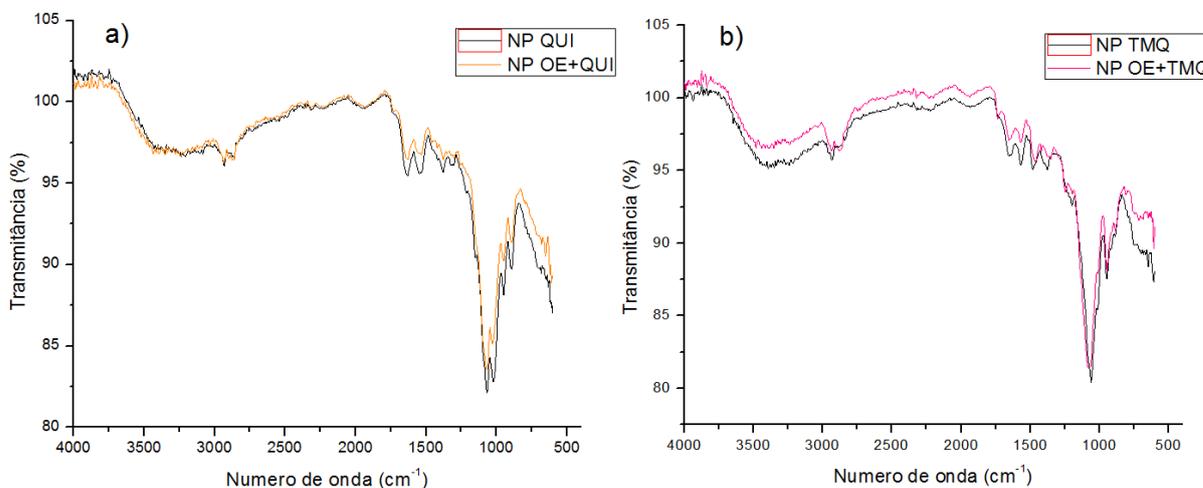


a- Espectro original da quitosana em comparação com NP_{QUI}; b- Espectro original do trimetilquitosana em comparação com NP_{TMQ}

FONTE: O AUTOR

Após o encapsulamento do óleo essencial de *L. grata* não foi observado mudanças significativas nos espectros em comparação com os espectros de NP não-encapsulados (Figura 13). Provavelmente, devido à baixa proporção em massa de OE em relação à NP não se observa mudanças significativas.

Figura 13 - Espectros de FTIR para amostras de nanopartículas encapsuladas com óleo essencial de *L. grata* a partir de quitosana, NP-OE_{QUI}, e do derivado trimetilado, NP-OE_{TMQ}, em comparação com os respectivos espectros de NP_{QUI} e NP_{TMQ}.



a- Espectro original da quitosana em comparação com NP OE_{QUI}; b- Espectro original do trimetilquitosana em comparação com NP OE_{TMQ}

FONTE: O AUTOR

5.3 TESTE DA ATIVIDADE MICROBIANA

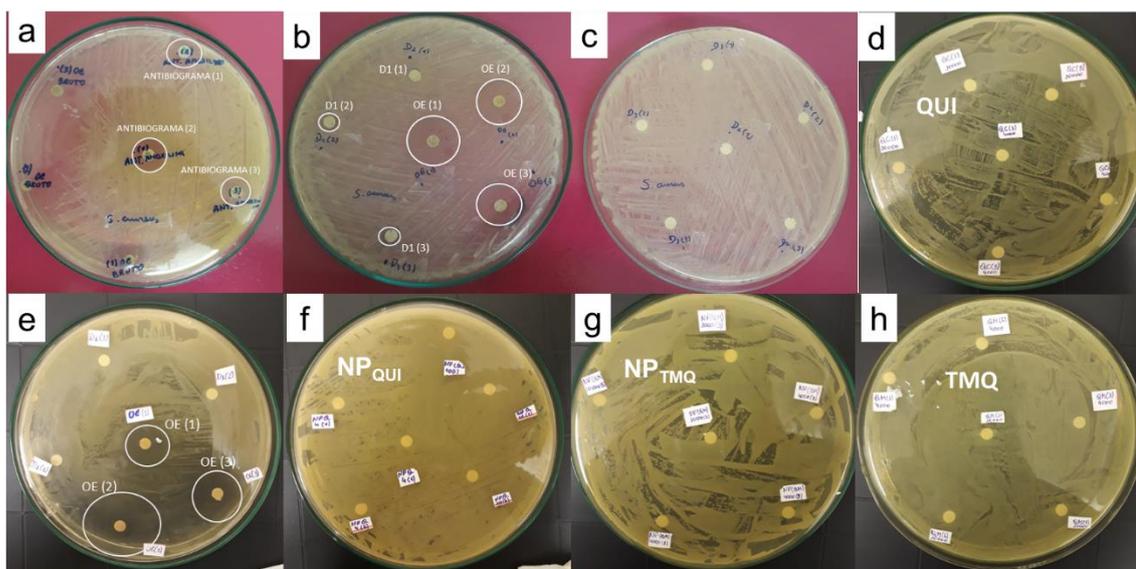
5.3.1 Antibiograma

O resultado desse teste foi observado após um período de 24 horas e foi bastante satisfatório. O OE de *L. grata* se mostrou um eficaz antimicrobiano, quando aplicado diretamente sobre as colônias, inibindo a proliferação delas. Nesse teste também foi possível observar halo de inibição significativo para o OE puro (Figura 14b,e) e sua diluição em 10x (D1) (Figura 14c). Enquanto para as demais diluições (D2 a D3) não houve formação de halo no teste de antibiograma. Isto ocorreu porque o OE de *L. grata* é um composto muito volátil e em baixa concentração pode evaporar do disco utilizado no teste.

Ao analisar as amostras de QUI (Figura 14d) e TMQ (Figura 14h) nas concentrações estudadas, observou-se que em ambas não houve formação de halos de inibição. Entretanto, não foi observado o desenvolvimento bacteriano sob os discos, indicando que inibiram o crescimento de ambas as bactérias por contato direto. Esse mesmo fato foi relatado nos trabalhos de Gabriel (2017), Carvalho (2020) e Leceta, et al. (2013). Logo, é possível sugerir que a ausência do halo ao redor do disco pode ser explicada pela limitação da difusão da quitosana em placa de MH ágar, então, diante disso, o uso do teste de antibiograma talvez não seja a melhor técnica

para definir a atividade antimicrobiana da quitosana. Porém, quando a metodologia foi alterada para o método de microdiluição em caldo os resultados foram satisfatórios, que serão discutidos mais adiante.

Figura 14 - Antibiograma para as cepas *S. aureus*.



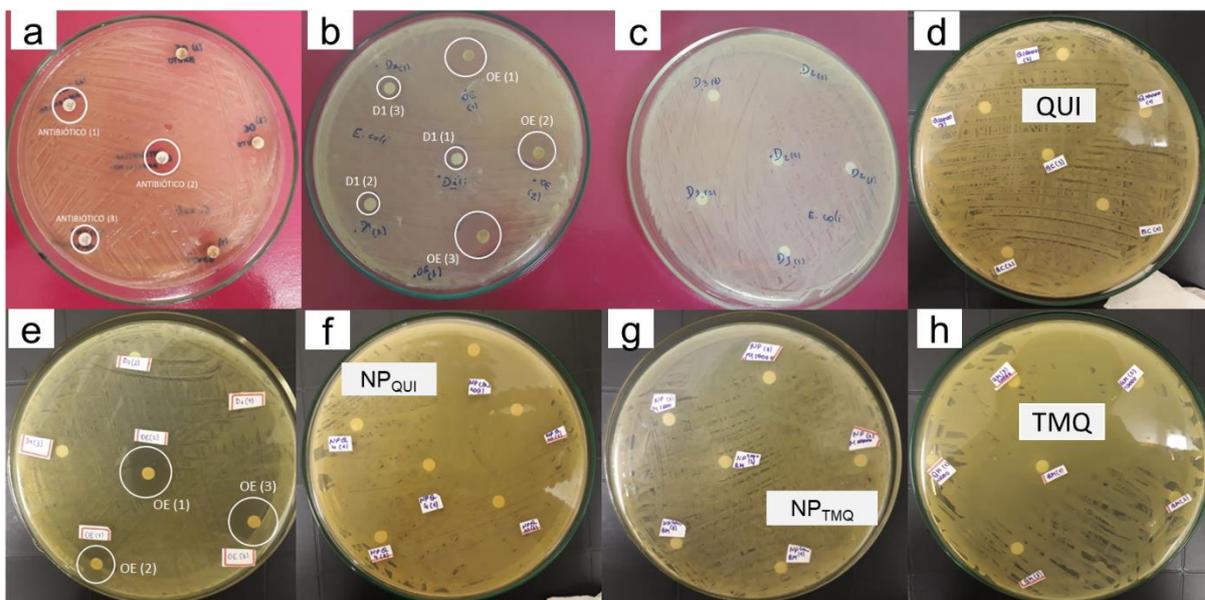
a- Amoxicilina (10 µL), b- OE e D1, c- D2 e D3, d- QUI, e- OE, f- NP_{QUI}, g- NP_{TMQ} e h- TMQ.

FONTE: O AUTOR

Quanto às amostras NP_{QUI} (Figura 14f) e NP_{TMQ} (Figura 14g), estas também não apresentaram halo de inibição em torno do disco. Isto pode ser explicado por semelhança ao das amostras de quitosana e seu derivado, que por estarem em meio MH ágar não ocorre a migração dessas amostras pelo meio, ou seja, possui baixa difusão pela placa. Além da concentração do OE presente nas NP corresponde a diluição de 100x (D2), ou seja, baixa quantidade de OE.

A partir da mensuração dos halos de inibição (Figuras 16 e 17), observou-se que o halo de inibição para a *S. aureus* foi semelhante ao encontrado para a *E. coli* (Tabela 5), tanto para o OE puro como para sua primeira diluição, D1, a 10x. Um fato muito importante observado é que o OE de *L. grata* apresenta halo de inibição superior ao antibiótico amoxicilina (controle positivo). Isto demonstra a potencialidade do OE de *L. grata* ao combate destes agentes bacterianos causadores da mastite.

Figura 15 - Antibiograma para as bactérias *E. coli*



a- Amoxicilina (10 µL), b- OE e D1, c- D2 e D3, d- QUI, e- OE, f- NP_{QUI}, g- NP_{TMQ} e h- TMQ.FONTE: O AUTOR

Tabela 5 - Diâmetros (mm) dos halos de inibição do óleo essencial de *L. grata* frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

Amostra	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
OE	26 ± 0,66	22 ± 0,44
OE diluído 10x (D1)	6 ± 1	9 ± 0,6
Amoxicilina	18 ± 1,33	17 ± 0,66

FONTE: O AUTOR

5.3.2 Teste de microdiluição – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

O teste de microdiluição apresentou resultado satisfatório para todas as amostras frente as bactérias Gran positiva (*S. aureus*) e Gran negativa (*E. coli*), com exceção das NP_{QUI}, que não apresentaram atividade CIM nem CBM para ambas as bactérias como representado na Tabela 6.

Os valores relativos à CIM e CBM do OE puro de *L. grata* obtidos foram iguais para as duas cepas de bactérias estudadas. Isto evidencia que atividade de inibição e bactericida do óleo essencial de *L. grata* não se diferenciam quanto às cepas bacterianas Gran positiva ou Gran negativa. Esta ação pode ser atribuída aos

compostos presentes no OE como o timol e carvacrol que compõem cerca de 6,3% e 78,6%, respectivamente (SOUZA, 2021) e tem ação semelhante entre as bactérias. O carvacrol, por exemplo, aumenta a permeabilidade da membrana citoplasmática microbiana, causando uma considerável perda de adenosina trifosfato citoplasmático, que é a principal molécula que fornece energia livre para as células realizarem diversas reações essenciais para a manutenção de suas células (SOUZA, 2006).

Considerando os resultados obtidos nesse trabalho, o OE de *L. grata* mostrou-se com uma ótima capacidade inibidora frente a microorganismos, assim como em outras espécies de plantas mencionadas em outras referências. O trabalho de Probst (2012) em que se verificou a capacidade de inibição de sete óleos essenciais (*Vernonia polyanthes L.*, *Rosmarinus officinalis L.*, *Baccharis dracunculifolia*, *Caryophyllus aromaticus L.*, *Cinnamomum zeylanicum L.*, *Matricaria recutita L.* e *Eugenia uniflora L.*) sobre quatro grupos de bactérias (*S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella*) e constatou que em todos os casos os OE apresentaram atividade antibacteriana.

Quanto à NP_{QUI}, nota-se que não foi possível observar a ação frente aos microorganismos estudados. Por outro lado, as NP_{TMQ} apresentaram atividade antibacteriana significativa, já que foi superior até mesmo que o OE de *L. grata*., sendo quatro vezes maior para a Gran negativa (*E. coli*) e dezesseis vezes maior para a Gran positiva (*S. aureus*). Isso acontece devido à diferença do polímero utilizado, em que a TMQ possui ação antimicrobiana superior, com valores maiores de CIM e CBM, à quitosana comercial (SUFFREDINI, VARELLA E YOUNES, 2007).

Com esse resultado foi constatado que derivados de quitosana como a TMQ, além de ter melhor capacidade de solubilidade em água a pH neutro, apresenta também atividade antibacteriana superior a da quitosana em função da maior interação iônica entre cargas positivas do derivado e resíduos presentes na superfície das células bacterianas negativamente carregados (SILVA, 2014).

Para Silva (2014), houve comparação CIM e CMB da TMQ e da quitosana, frente a bactérias Gram-positiva e Gram-negativa (*E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. vulgaris* e *Salmonella enterica*), em que o derivado da quitosana obteve melhor resultado. Esse resultado se repete em pesquisas que avaliaram a atividade antimicrobiana de quitosana e TMQ (PAULO, BRESOLIN E ASSIS, 2017;

MENDES et al., 2016; DIAS, 2017).

Essa diferença nos valores de CIM e CBM (Tabela 6) entre as cepas bacterianas Gram positiva e Gram negativa, pode ocorrer porque as bactérias Gram positivas apresentam uma maior sensibilidade quando expostas aos óleos essenciais *in vitro* que as bactérias Gram negativas (PROBST, 2012). As bactérias Gram-negativas possuem parede bacteriana diferenciada, apresentando uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos, conferindo maior resistência por evitar a difusão e acúmulo de OE na célula bacteriana (IMELOUANE et al., 2009).

Tabela 6 - Valores de CIM e CBM (ppm) contra *S. aureus* e *E. coli* para os diferentes materiais estudados: óleo essencial de *L. grata*, nanopartículas (NP_{QUI}, NP_{TMQ}), nanopartículas encapsuladas (NP-OE_{QUI}, NP-OE_{TMQ}) e os polímeros originais (QUI, TMQ).

Amostras	Cepa de <i>E. coli</i>		Cepa de <i>S. aureus</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM
OE	500	500	500	500
NP _{QUI}	---	---	--	---
NP _{TMQ}	125	125	31,25	31,25
NP-OE _{QUI}	250	250	15,62	15,62
NP-OE _{TMQ}	250	250pp	> 15,62	> 15,62
QUI	250	250	62,5	62,5
TMQ	250	250	31,25	31,25
DTG	250	250	125	125
DTG + OE	250	250	125	125
DTG + NP-OE _{QUI}	125	250	62,5	125
DTG + NP-OE _{TMQ}	250	250	125	125

FONTE: O AUTOR

Ao analisar as formulações do detergente observar-se que o detergente puro (DTG) apresentou um resultado bom, pois quando comparado com CIM e CBM do OE na concentração de 4.000 ppm, houve uma redução pela metade nas concentrações de CIM e CBM para a cepa da *E. Coli* e ¼ para a cepa da *S. aureus*. Esse mesmo fato ocorreu com a formulação de detergente contendo o OE na

concentração de 2.000 ppm e as nanopartículas de TMQ com OE na mesma concentração (Tabela 6).

Porém, a formulação contendo NP-OE_{QUI}, apresentou menor valor de CIM e CBM entre os detergentes, ficando bem semelhante com o valor obtido com a solução de quitosana. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que nessa formulação ao se adicionar as NP-OE_{QUI} ao detergente, que estava em um pH de 7, a quitosana precipitou (Figura 18). Logo o CIM e CBM dessa formulação tinha particulados do polímero o que gerou uma inibição maior frente as cepas.

Diante dos resultados obtidos, é possível observar a presença da ação sanitizante das formulações do detergente, e que na da literatura consultada o uso do detergente como produto sanitizantes de utensílios frente a bactéria causadores de infecção vem tendo grande destaque. Na pesquisa de Costa Luciano et al. (2016), por exemplo, foi feita uma avaliação da capacidade de diferentes detergentes para remover e matar organismos como *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Já no trabalho de Mati (2018), foi estudado a ação de detergentes enzimáticos na limpeza de aparelhos hospitalares contaminados por microorganismos. Em outra pesquisa, Scalzadona (2019) avaliou diferentes detergentes na remoção de biopelículas bacterianas.

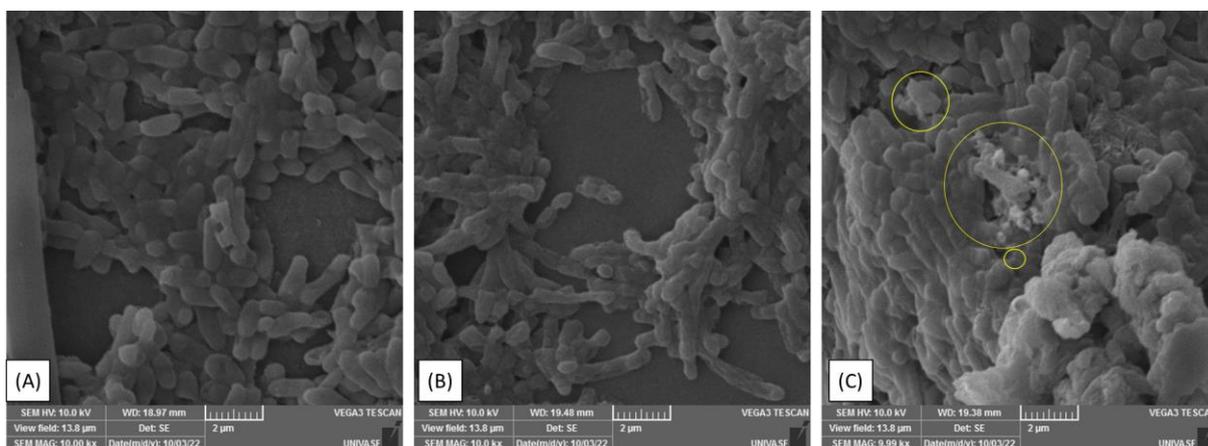
Neste experimento também foi possível observar que, ao se encapsular o OE, o efeito frente às cepas aumentou significativamente tanto para a *E. coli* quanto para *S. aureus*. Isso indica que a incorporação nas nanopartículas de quitosana e TMQ, além de estabilizar o OE, potencializou sua ação antimicrobiana. E que é possível produzir um detergente com ação sanitizante eficiente para os processos de limpeza e desinfecção dos utensílios e equipamentos de ordenha.

5.3.3 Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Nas análises de microscopia eletrônica de varredura da *E. coli* e *S. aureus*, foram observadas alterações na morfologia (Figura 16 e Figura 17). As cepas de controle, ou seja, sem tratamentos com o OE ou com as NP-OE_{QUI}, apresentaram formas regulares no formato de bastonetes para a *E. coli* (Figura 16a) e de cocos para as cepas de *S. aureus* (Figura 17a) e sem alteração na morfologia e sem cicatrizes. No entanto, as células submetidas ao tratamento com OE foram apresentaram alterações na morfologia, como contorno irregular e alterações na

superfície, resultante do extravasamento de conteúdo intracelular (Figura 16b e 19b).

Figura 16 – Imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura da cepa de *E. coli* sem tratamento (a) e com os tratamentos (b) OE e (c) NP-OE_{QUI}.



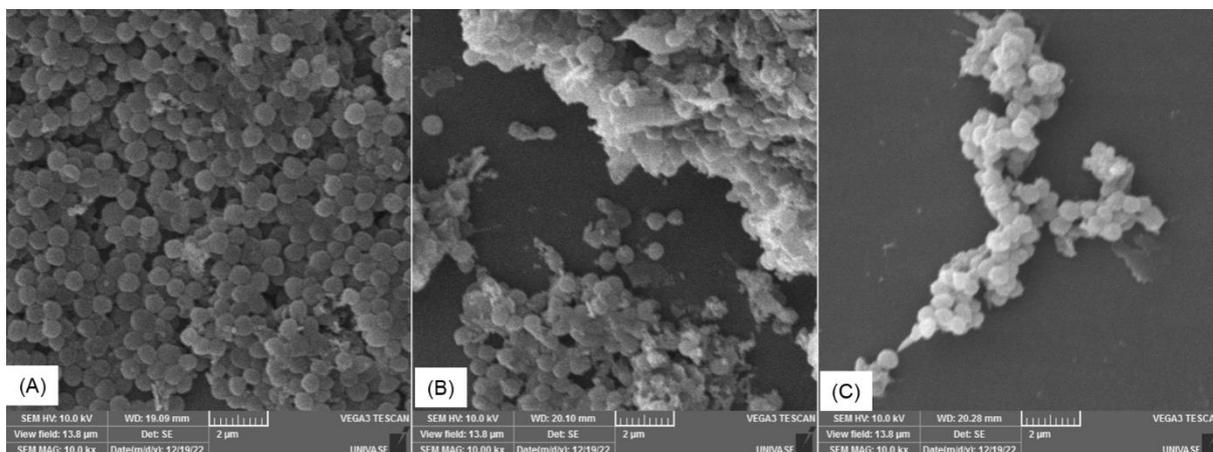
FONTE: O AUTOR

Esse resultado confirma informações encontradas na literatura sobre a ação do OE na morfologia de bactérias, como no trabalho Silva (2018), que caracterizou OE de folhas das espécies *Hymenaea eriogyne Benth*, *Hymenaea longifolia Benth* e *Hymenaea rubriflora Ducke* e avaliou as alterações ultraestruturais e atividade antimicrobiana contra bactérias multirresistentes e leveduras, como a *E. coli* e a *S. aureus*.

No tratamento com as NP-OE_{QUI} nas células *E. coli* formaram aglomerados, dificultando um pouco a visualização, porém na região que foi destacada é possível observar (Figura 16c) células bacterianas com extravasamento do conteúdo e presença de nanopartículas próximas a célula que teve alteração na morfologia.

Enquanto para cepas de *S. aureus* as células contendo o tratamento com NP-OE_{QUI} diminuiriam de tamanho indicando o extravasamento do conteúdo, ficaram mais dispersas quanto comparada com cepas sem tratamento e com o OE (Figura 17c).

Figura 17 – Imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura da cepa de *S. aureus* sem tratamento (a) e com os tratamentos (b) OE e (c) NP-OE_{QUI}.



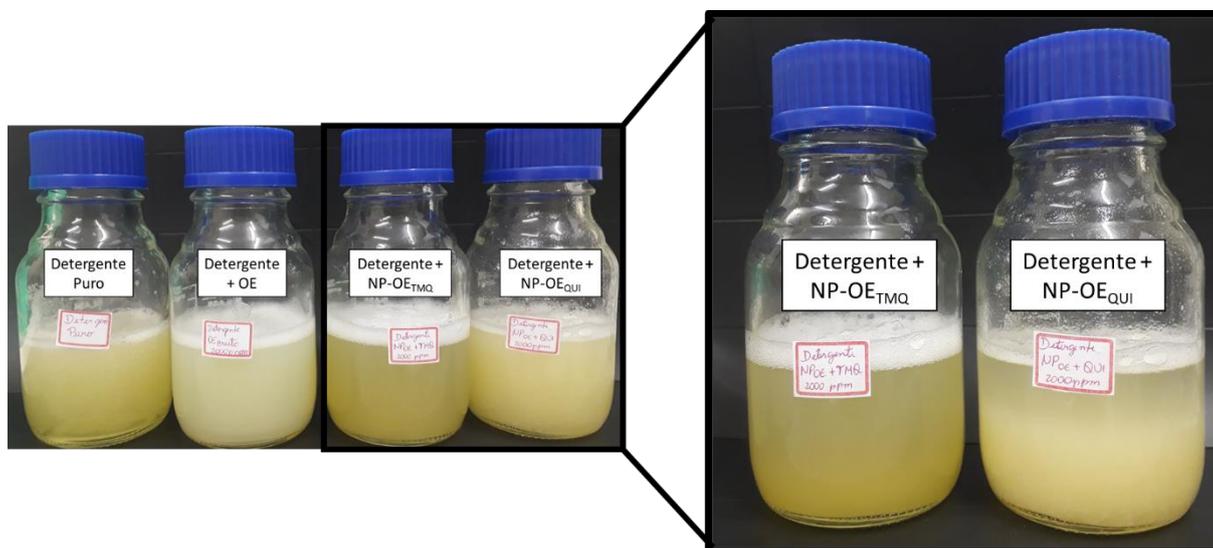
FORNE : O AUTOR.

De forma geral, tanto o OE quanto as NP-OE_{QUI} mostraram-se eficientes no tratamento das cepas bacterianas. Este resultado está de acordo com Trifan et al., (2020) os quais afirmaram que o OE possui um grande potencial antimicrobiano para diferentes microrganismos, pois em sua composição majoritária tem carvacrol e o timol que podem atuar como agentes de ruptura na membrana das bactérias, provocando vazamento de conteúdo celular e coagulação do citoplasma, que são componentes vitais da célula bacteriana.

5.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA FORMULAÇÃO

Os detergentes preparados apresentaram aspecto homogêneo para as amostras de detergente puro, contendo OE e o com as NP-OE_{TMQ}. Por outro lado, a formulação com NP-OE_{QUI}, as partículas precipitaram assim que foi adicionado a base do detergente. Isso pode ter ocorrido porque o pH da solução estava neutro e como a quitosana possui limitação na solubilidade em meio alcalino e neutro ela precipitou (Figura 18).

Figura 18 – Foto das quatro formulações de detergente e em destaque a que contém as NP-OE_{TMQ} e NP-OE_{QUI}.



FONTE: O AUTOR

Quanto as análises potenciométricas, as formulações do detergente apresentaram resultados interessante (Tabela 7), pois o detergente puro ficou com pH 7, enquanto nas outras formulações contendo OE e NP-OE_{TMQ} o valor do pH caiu, ficando 6,2 e 6,54, respectivamente. Porém o detergente com NP-OE_{QUI}, apresentou pH 5,09; ou seja, ficou ácido, devido a quitosana, não sendo viável o seu uso. Segundo a ANVISA (2007) os produtos incluídos na categoria de detergentes líquidos específicos para lavar utensílios de forma manual de venda livre, o pH deve estar compreendido entre 5,5 e 9,5.

Tabela 7 - Resultados dos valores de pH e espumação das quatro formulações preparadas a partir da base de detergente.

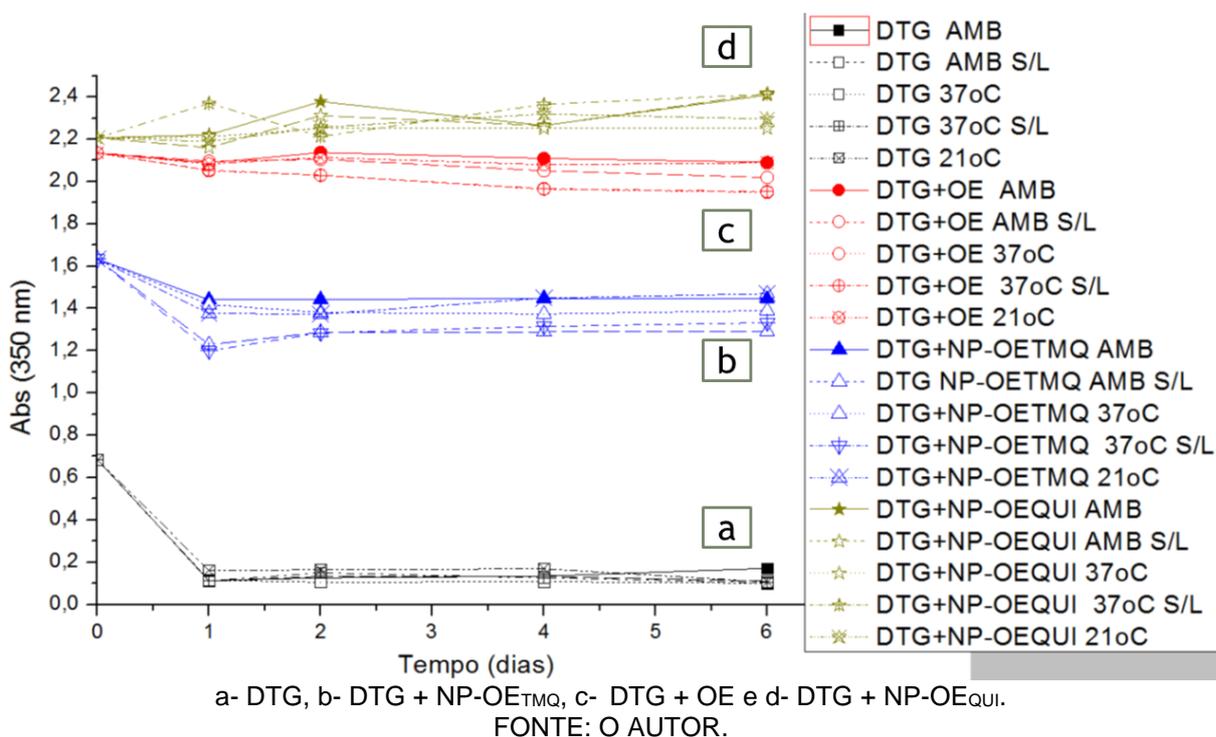
Amostra	Caracterização Físico-química	
	pH	Espumação (cm)
DTG	7,0	23,3 ± 1,1
DTG + OE	6,2	22 ± 1,3
DTG + NP-OE _{TMQ}	6,54	21,3 ± 1,7
DTG + NP-OE _{QUI}	5,09	25 ± 0

FONTE: O AUTOR.

Para o teste de espumação, as amostras contendo OE e NP-OE_{TMQ} não apresentaram diferença significativa em relação ao detergente puro. Por outro lado, a amostra com NP-OE_{QUI} apresentou valor de espumação maior (Tabela 7). Nessa propriedade, as formulações dos detergentes obtiveram ótimos valores, quando comparados com dados encontrados na literatura. No trabalho de Theves (2017), por exemplo, que elaborou um detergente sem adição de trietanolamina e os valores de espumação ficaram em torno de 6 cm, mais de três vezes menor do que os alcançados nas formulações desse trabalho. Este é um dado muito importante uma vez que a espumação está associado com a percepção do consumidor, que quanto a maior espumação remete a ideia de maior limpeza.

Na estabilidade dos detergentes, avaliada por espectrofotometria no UV-visível durante 6 dias, em três temperaturas diferentes (21°C, ambiente e 37°C) e ausência/presença de luz, não houve diferença significativa entre os dias avaliados, quando se avaliou o comprimento de onda de 350 nm, com exceção do detergente puro (DTG) e com adição de NP-OE_{TMQ} (DTG + NP-OE_{TMQ}), que tiveram uma pequena diminuição no valor de absorbância do dia zero ao dia um de avaliação (Figura 19). Desta forma, as formulações não apresentaram variação entre as condições de armazenamento.

Figura 19 – Representação gráfica de tempo (dias) versus absorvância em 350 nm para os diferentes materiais.

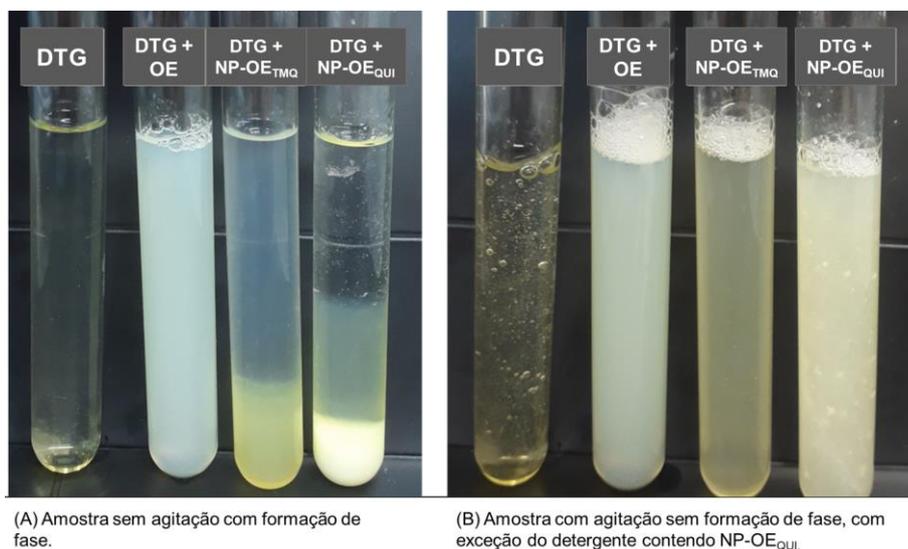


No entanto, observa-se que houve diferença significativa após a adição dos componentes em relação ao detergente puro, pois ocorreu formação de fases após um certo tempo de repouso (Figura 20). Porém, no momento da avaliação por espectroscopia as amostras foram agitadas, adquirindo aparência mais dispersa. A única amostra que apresentou formação de precipitado constante foi a com NP-OEQUI em que o precipitado de quitosana ficou constante não se dispersando com a agitação.

Por outro lado, observa-se que as formulações apresentaram valores absolutos de absorvância muito distintos entre si (Figura 19). A formulação controle de detergente puro (DTG) apresentou os valores mais baixos de absorvância (~0,1), praticamente constante durante o armazenamento. Por outro lado, as formulações DTG+OE e DTG+NP-OEQUI foram as que apresentaram os maiores valores absolutos de absorvância (~2,0-2,4) com maiores valores de dispersão entre as condições de armazenamento (Figura 19). Porém, a formulação DTG+NP-OETMQ apresentou valores de absorvância intermediários (~1,4), ficando mais próximo do detergente puro. Isto indica que o sistema com TMQ foi o mais adequado para a dispersão do OE na formulação de detergente. Esta menor opalescência da amostra

com TMQ fica bem evidente no registro fotográfico (Figura 20), indicando o derivado TMQ é mais adequado tanto para a melhor dispersão como também para maior capacidade antibacteriana.

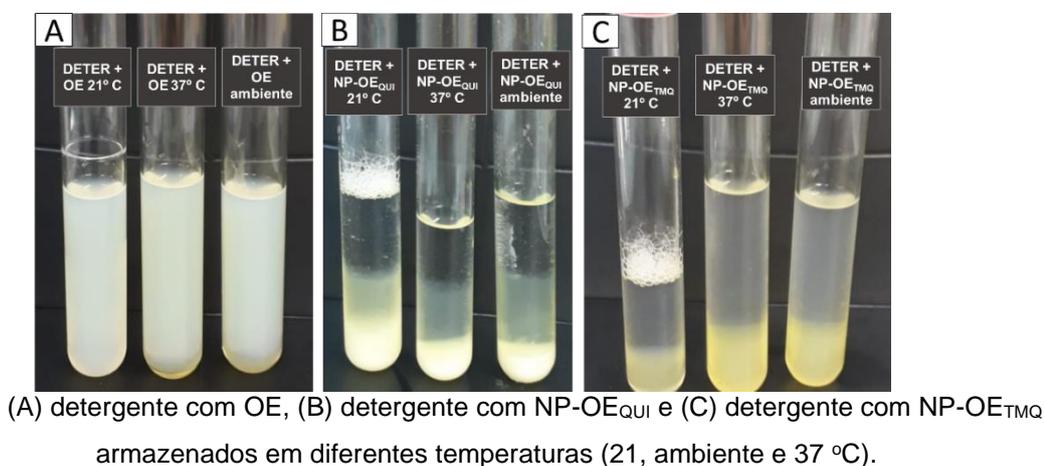
Figura 20 – Formulações de detergente com aspectos distintos com e sem agitação.



FONTE: O AUTOR.

Ao avaliar os registros fotográficos, a formulação de detergente contendo OE puro (DTG+OE), no sexto dia de armazenamento, observou-se que em temperatura mais baixa (21°C) o detergente permaneceu sem formar fases ou precipitado, porém para as amostras armazenadas a temperatura ambiente e a 37°C houve a formação de fases. Isto é indicativo de ocorrência de instabilidade da formulação com OE em temperaturas mais elevadas (Figura 21).

Figura 21 – Foto das amostras dos detergentes no sexto dia de avaliação sem agitação.



FONTE: O AUTOR

Para as amostras de detergente com nanopartículas de quitosana com OE (NP-OE_{QUI}) houve a formação de três fases, sendo uma delas formada devido à quitosana que precipitou assim que entrou em contato com a base do detergente que estava com pH 7. A terceira fase foi formada no decorrer dos dias de avaliação. Para a amostra de detergente com NP-OE_{TMQ}, houve formação de fases apenas durante o tempo de armazenamento. No entanto, o aspecto heterogêneo desta formulação foi menos intenso que o observado para a formulação com NP-OE_{QUI} e adquirindo aspecto homogêneo ao agitar-se a formulação.

6. CONCLUSÕES

- O óleo essencial de *Lippia grata* pode ser encapsulado satisfatoriamente bem em nanopartículas de quitosana e trimetilquitosana via gelificação com tripolifosfato, utilizando o solvente DMSO 1,5%.
- A caracterização por espectroscopia no infravermelho mostrou mudanças nos padrões de bandas NH₂ e OH, indicando a formação de nanopartículas.
- A atividade antimicrobiana, via antibiograma, mostrou ocorre uma relação entre a capacidade de difusão da amostra e o meio MH ágar no qual é formado o halo de inibição sendo uma metodologia que precisa ser ajustada para as amostras de QUI, TMQ, NP_{QUI} e NP_{TMQ}.
- Os testes de CIM e CBM apresentaram resultados significativos em todas as amostras testadas, em que o OE não apresentou diferença entre as cepas testadas e nem entre o CIM E CBM. Porém, nas amostras QUI, TMQ, NP_{QUI} e NP_{TMQ} houve uma variação significativa no CIM e CBM frente as cepas Gram-negativas e Gram-positivas, devido a maior sensibilidade das bactérias Gram-positivas (*S. aureus*).
- O análise de microscopia eletrônica de varredura das células de *E. coli* e *S. aureus*, foram observadas alterações na morfologia como tamanho irregular, alterações na superfície, que resultar no extravasamento de conteúdo intracelular.
- O sistema com TMQ foi o mais adequado para a dispersão do OE na formulação de detergente, ficando mais próximo do detergente puro.
- O óleo essencial de *L. grata* apresenta atividade antimicrobiana, sendo potencializado pelo encapsulamento, que permitiu agregar ação bactericida à base detergente comum, sendo uma alternativa de profilaxia da mastite de caprinos por meio da higienização dos utensílios utilizados durante as ordenhas e entre as ordenhas.

REFERÊNCIAS

ABD EL-HACK, Mohamed E.; Mohamed T. El-Saadony; Manal E. Shafic; Nidal M. Zabermaawi; Muhammad Arif; Gaber Elsaber Batiha; Asmaa F. Khafaga ; Yasmina M. Abd El-Hakimi; Adham A. Al-Sagheerj. **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.

ALVES, Brenner Frederico Carvalho; CHAVES, Ana Júlia Silveira; VIEIRA, Natâne Flávia; CHAVES, Glauco Vinício; FRANÇA; Patrícia Maria de; BAREZANI, Amanda Soriano Araújo, SOARES, Paulo Henrique Araújo. **Sensibilidade de Staphylococcus aureus aos antimicrobianos usados no tratamento da mastite bovina: Revisão**. Pubvet, v. 14, p. 141, 2019.

ALVES, Thâmela; MOREIRA, Maria Aparecida Scatamburlo. **Mastite bovina: Tratamento convencional e ação de compostos extraídos de plantas**. UNICIÊNCIAS, v. 25, n. 1, p. 20-25, 2021.

AMADUCI, Márcia Regina Lombardo. **Efeitos do Campo Eletromagnético em Células e Bactérias**. 2007, 103f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Eletrica) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. 2007.

ANDRADE, Gabriel Henrique Oliveira Virgens. 2021. 68 f. **Criação de ovinos e caprinos na região do Nordeste da Bahia: desafio e potencialidades**. Monografia (Engenharia Agrônômica) – AGES / Paripiranga 2021.

ANVISA. **Manual do Usuário Peticionamento Eletrônico de Registro de Produto Saneante**. Brasília-DF, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2016.

ANVISA; **RDC Nº 13, DE 28 DE FEVEREIRO DE 2007**. Acesso em: 17 de nov. 2017.

ARAÚJO, Luana Silva; ARAÚJO, Renato Silva; SERRA, Josilene Lima; NASCIMENTO, Adenilde Ribeiro. **Composição química e susceptibilidade do óleo essencial de orégano (Origanum vulgare L., família Lamiaceae) frente a cepas de Escherichia coli, Staphylococcus aureus e Salmonella choleraesuis**. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 33, n. 1, 2015.

ARAUJO, Márcio Martins de; LONGO, Priscila Larcher. **Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de Origanum vulgare (orégano) diante das cepas de Escherichia coli e Staphylococcus aureus**. Arquivos do Instituto Biológico, v. 83, 2016.

ASSADPOUR, Elham; MAHDI JAFARI, Seid. **Uma revisão sistemática sobre nanoencapsulação de ingredientes bioativos de alimentos e nutracêuticos por vários nanocarreadores**. Revisões críticas em ciência dos alimentos e nutrição , v. 59, n. 19, pág. 3129-3151, 2019.

ASTM. **Standard Terminology Relating to Nanotechnology**. Active Standard ASTM E2456, 2012.

BAKSHI, Prasanna S.; SELVAKUMAR, Duraisamy; KADIRVELU, Kavitha; KUMAR, Naresh Samba. **Chitosan as an environment friendly biomaterial—a review on recent modifications and applications**. International journal of biological macromolecules, v. 150, p. 1072-1083, 2020.

BAPTISTA, Nelânia Maria de Queiroz. **Investigação de propriedades biológicas de óleos essenciais de Lippia sp.(Verbenaceae)**. 2018, 118 f.2018. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2018.

BARROS, Bruno de Cássio Veloso de; SABINO, Saulo; SABINO, Giselle Castro; TAVARES, Maria Isabel de Souza Strela; SOUZA, Cibely Souza; RODRIGUES, Érika Dayane Leal; SILVA, Raimundo Nelson Souza da. **Avaliação da qualidade sanitária do pescado salgado seco comercializado nas feiras livres de Belém, PA**. Hig. aliment., p. 109-113, 2012.

BELMONTE, Bernardo do Rego. **Avaliação de atividades antimicrobiana, amebicida e esquistossomicida de metabólitos secundários e lectina de origem vegetal**. 2019. Tese (Doutorado em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

BEURON, Daniele Cristine; BOTARO, Bruno Garcia; CORTINHAS, Cristina Simões; MACEDO, Susana Nori; GONÇALVES, Juliano Leonel; BRITO, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva.; SANTOS, Marcos Vinicius. **Fatores de risco associados à resistência antimicrobiana de Staphylococcus aureus isolado de mastite bovina**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 34, n. 10, p. 947-952, 2014.

BILIA, Anna Rita; GUCCIONE, Clizia; Isacchi, Benedetta; RIGHESCHI, Chiara; FIRENZUOLI, Fabio; BERGONZI, Maria Camilla. **ESSENTIAL oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. v. 2014, ID 651593. 2014.

BRAGA, Raiza Araujo; TIRONI, Stella Maris Teobaldo; TAIRA, Augusto Ryonosuke; OLIVEIRA, Mariana Gonçalves; BONATO, Denis Vinícius; VRISMAN, Dayane Priscila; SILVA, Marlon Richard Hilário da; TEIXEIRA, Pedro Paulo Maia. **Morfofisiologia, afecções e diagnóstico ultrassonográfico da glândula mamária em bovinos: revisão de literatura**. Nucleus Animalium, v. 7, n. 1, p. 2, 2015.

BRITTO, Douglas de ; ASSIS, Odílio Benedito Garrido. **A novel method for obtaining a quaternary salt of chitosan**. Carbohydrate Polymers, v. 69, n. 2, p. 305-310, 2007.

BRITTO, Douglas de ; ASSIS, Odílio Benedito Garrido. **Propriedades físico-químicas de N, N, N-Trimetilquitosana relevantes ao revestimento de frutas minimamente processadas**. Anais do V Workshop da Rede de Nanotecnologia aplicada ao agronegócio 2009 - São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2009. ISSN: 2175-8395

BRITTO, Douglas de; ASSIS, Odílio Benedito Garrido. **Chemical, biochemical, and microbiological aspects of chitosan quaternary salt as active coating on sliced apples.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 32, n. 3, p. 599-605, 2012.

BRITTO, Douglas de; ASSIS, Odílio Benedito Garrido. **Potencial antifúngico a *Penicillium expansum* de filmes de polissacarídeos à base de quitosana e trimetil quitosana.** Embrapa Semiárido-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E), 2020.

BRITTO, Douglas de; MOURA, Márcia R. de; AOUADA, Fauze A.; MATTOSO, Luiz H.C.; ASSIS, Odílio B.G. **N, N, N-trimethyl chitosan nanoparticles as a vitamin carrier system.** *Food Hydrocolloids*, v. 27, n. 2, p. 487-493, 2012.
doi:10.1016/j.foodhyd.2011.09.002

BRITTO, Douglas de; MOURA, Marcia R. de; AOUADA, Fauze A.; PINOLA, Flavia G.; LUNDSTEDT, Lícia M.; ASSIS, Odílio Benedito Garrido; MATTOSO, Luis H. C. **Entrapment characteristics of hydrosoluble vitamins loaded into chitosan and N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles.** *Macromolecular Research*, v. 22, n. 12, p. 1261-1267, 2014. <https://doi.org/10.1007/s13233-014-2176-9>.

CARLOS, Aires Walter Mavunge; REBECA, Luquengui; AURELIO, Sergio Valentino; GUARDA, Nataniel; PIRES, Mavilde Leopoldina; FELIX, Africa Olimpia de Jesus; NOEL, Kialanda Maria Monteiro; ANTÓNIO, Armindo Paixão. **Diagnóstico de *Staphylococcus spp*: uma análise retrospectiva de dados laboratoriais.** RECIMA21 – Revista Científica Multidisciplinar – ISSN 2675-6218, v. 3, n. 7, p. e371729-e371729, 2022.

CARVALHO, Ellen Morais de. **Avaliação da capacidade antibacteriana de membranas de quitosana modificada com cobre de prata.** 2020, 9f. Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2020.

CASTELLÓ, María Emilia; ANBINDER, Pablo; AMALVY, Javier; PERUZZO, Pablo. **Production and characterization of chitosan and glycerol-chitosan films.** *MRS Advances*, v. 3, n. 61, p. 3601-3610, 2018. doi:10.1557/adv.2018.589

CHANDRASEKARAN, Murugesan; KIM, Ki Deok; CHUN, Se Chul. **Antibacterial activity of chitosan nanoparticles: A review.** *Processes*, v. 8, n. 9, p. 1173, 2020.

CHOPDE, Santos; DATIR, Rupesh; DESHMUKH, Gajanan; DHOTRE, Anant; PATIL, Madhav. **Nanoparticle formation by nanospray drying & its application in nanoencapsulation of food bioactive ingredients.** *Journal of Agriculture and Food Research*, v. 2, p. 100085, 2020.

CHUNG, Ying-Chien; SU, Ya-ping; CHEN, Chiing-chang; JIA, Guang; WANG, Huey-lan; WU, J C Gaston; LIN, Jaung-geng. **Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall.** *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 25, n. 7, p. 932-936, 2012.

CLSI. M07-A9: **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved Standard – 9.** ed. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, v.32, n.2, 2012.

CORRÊA, Cristiane da Silva de Souza. **Nanoprópolis no tratamento da mastite subclínica bovina: avaliação in vivo da eficácia via intramamárias durante o período de lactação.** 2018, 90p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

COSTA LUCIANO, Cristiana da; OLSON, Nancy; FERREIRA, Anaclara; ALFA, Michelle. **Evaluation of the ability of different detergents and disinfectants to remove and kill organisms in traditional biofilm.** American journal of infection control v. 44, n. 11, p. e243-e249, 2016.

COSTA, Patrícia Silva; SOUZA, Elnatan Bezerra de; BRITO, Erika Helena Salles de; FONTENELLE, Raquel Oliveira dos Santos. **Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero Lippia sensu lato (Verbenaceae).** Hoehnea , v. 44, p. 158-171, 2017.

COSTA, Sara Ester de Lima. **Atividade antiproliferativa e citotóxica do óleo essencial e extrato hidroalcolólico provenientes da Lippia grata SCHAUER.** 2019. 73f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

CURTI, Elisabete. **Estudos de obtenção e caracterização de N,N,N - trimetilquitosana e de seu comportamento viscosimétrico em solução aquosa.** 2004. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004. . Acesso em: 17 nov. 2022.

DA SILVA, Anderson; Iacuzio, Raiza; CÂNDIDO, Talita Junia da Silva; RODRIGUES, Marjory Xavier; SILVA, Nathália Cristina Cirone. **Resistência antimicrobiana de Salmonella spp., Staphylococcus aureus e Escherichia coli isolados de carcaças de frangos: resistência a antibióticos e óleos essenciais.** Revista brasileira de agropecuária sustentável, v. 8, n. 1, 2018.

DA SILVA, Lucia Regina Cangussu. **Microbiologia da água.** Microbiologia E Saúde, 2020. Disponível em: <https://www.luciacangussu.bio.br/atlas/escherichia-coli/> . Acesso em: 27 de setembro de 2022.

DE BARROS, Mariana; PERCIANO, Pedro Grifo; DOS SANTOS, Marcelo Henrique; DE OLIVEIRA, Leandro Licursi; COSTA, Éderson D'Martin; MOREIRA, Maria Aparecida Scatamburlo. **Antibacterial Activity of 7-Epiclusianone and Its Novel Copper Metal Complex on Streptococcus spp. Isolated from Bovine Mastitis and Their Cytotoxicity in MAC-T Cells.** Molecules, v. 22, n. 5, p. 823, 2017.

DE CASTRO GUIMARÃES, Caroline; FERREIRA, Tatiane Caroline; DE OLIVEIRA, Roselene Canato Felipe; SIMIONI, Patricia Ucelli; UGRINOVICH, Leila Aidar. **Atividade antimicrobiana in vitro do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (Rosmarinus officinalis L.) e do cravo-da-índia (Caryophyllus**

aromaticus L.) frente a cepas de Staphylococcus aureus e Escherichia coli. Revista Brasileira de Biociências, v. 15, n. 2, 2017.

DE QUEIROZ ANTONINO, Rayane Santa Cruz Martins; LIA FOOK, Bianca Rosa Paschoal; DE OLIVEIRA LIMA, Vítor Alexandre; De Farias Rached, Raid Ícaro; LIMA, Eunice Paloma Nascimento; DA SILVA LIMA, Rodrigo José; PENICHE COVAS, Carlos Andrés; LIA FOOK, Marcus Vinícius. **Preparation and characterization of chitosan obtained from shells of shrimp (Litopenaeus vannamei Boone).** Marine Drugs, v. 15, n. 5, p. 141, 2017.
<https://doi.org/10.3390/md15050141>

DEDAVID, Berenice Anina; GOMES, Carmem Isse; MACHADO, Giovanna. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores.** EdiPUCRS, 2007.

DIAS, Amanda Manchini. **Derivados anfifílicos de quitosana como agentes antimicrobianos: estudo da atividade e mecanismo de ação.** 2017, f 86. Dissertação (Mestrado em Química dos Materiais e Nanotecnologia) Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Disponível em:
<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/150702?show=full>. Acesso em: 20 de set. 2022.

EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. **Nanoencapsulation techniques for Food Bioactive components: A Review.** Food and Bioprocess Technology, v. 6, n. 3, p. 628–647, 2013.

FABIANO, Giovana Garcia; AGUERA, Raul Gomes; DO PRADO, Daniela Biral. **Eficiência de detergentes na remoção de biofilmes de cepa de Escherichia coli em superfície de aço inoxidável.** Revista Uningá, v. 57, n. 4, p. 46-56, 2020.

FAN, Wen; YAN, Wei; XU, Zushun; NI, Hong. **Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 90, n. 1, p. 21–27, 2012.

FANIN, Nicolas; ALAVOINE, Gonzague; BERTRAND, Isabelle. **Temporal dynamics of litter quality, soil properties and microbial strategies as main drivers of the priming effect.** Geoderma, v. 377, p. 114576, 2020.

FELIPPE, Maria Justina Dalla Bernardina et at. **Manual de biossegurança.** Botucatu : Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, 2018. ISBN: 978-85-69376-08-8

FERNANDES, Fernando da Costa; FEIJÓ, Francisco Marlon Carneiro, RODRIGUES, Gardênia Silvana de Oliveira. **Avaliação do potencial antimicrobiano do decocto da folha do cajá (Spondias mombin L) na prevenção da mastite bovina.** 2019, 61 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharel em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do

Semi-Árido, Campus Mossoró, 2019. Disponível em:
<https://repositorio.ufersa.edu.br/handle/prefix/3142>. Acesso em: 18 jul. 2022.

FERNANDES, Luciana Cristina Borges; ALBUQUERQUE, Cynthia Cavalcanti de; JÚNIOR, Rui Sales; OLIVEIRA, Francisco Fábio Mesquita; GURGEL, Eleneide Pinto; MESQUITA, Maria Valdiglêzia de; SILVA, Mônica Danielle Sales da. **Fungitoxicidade dos extratos vegetais e do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer sobre o fungo *Monosporascus cannonballus* Pollack e Uecker**. Summa Phytopathologica, v.41, n.2, p.153-155, 2015.

FERREIRA, Joana Filipa Santos. **Nanoencapsulação de óleos essenciais para aplicação cosmética**. 2019, 76f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de Coimbra 2019.

FOLLMANN, H. D. M.; MARTINS, A. F.; NOBRE, T. M.; BRESOLIN, J. D.; CELLET, T. S. P.; VALDERRAMA, P.; CORREA, D. S.; MUNIZ, E. C.; OLIVEIRA JÚNIOR, O. N. **Extent of shielding by counterions determines the bactericidal activity of N,N,N-trimethyl chitosan salts**. Carbohydrate Polymers, v. 137, p. 418-425, 2016.

FONSECA, Maria Eduarda Barbosa da; MOURÃO, Anderson Moreira; CHAGAS, Jônathan David Ribas; ÁVILA, Letícia Meirelles; MARQUES, Thiago Luiz Pereira; BAÊTA, Bruna de Azevedo; MORAES, Renata Fernandes Ferreira de; ROIER, Erica Cristina Rocha. **Mastite bovina: Revisão**. PUBVET, v. 15, p. 162, 2020. INSS 19821263.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Artmed Editora, 2013.

FRANÇA, Kevison Romulo da Silva. **Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Lippia gracilis* (Schauer) in vitro sobre fitopatógenos**. 2019. 55 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Sistemas Agroindustriais) - Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, Paraíba, Brasil, 2019.

GABRIEL, Juliana dos Santos. **Bionanocompósitos de derivados de quitosana/montmorilonita/nanopartículas de prata preparadas via fotoquímica**. Tese de Doutorado em Físico-Química - Universidade de São Paulo. 2017. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75134/tde-09082017-154353/en.php> . Acesso em 20 de set.2022.

GARCIA, Sonia Maria da Silva. **Desenvolvimento e caracterização de hidrogel de quitosana aditivado com óxido de zinco e óleo essencial de *Schinus terebenthifolius raddi* (pimenta rosa)**. 2018, 117f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Ciência de Materiais. Recife, 2018.

GASPAR, Maria Eduarda de Farias Albuquerque; PEIXOTO, Christina Alves; AMORIM, Rosa Valéria da Silva. **Ultrastructural analysis of chitosan antibacterial activity against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli***. Advances in Microbiology, v. 9, n. 10, p. 893, 2019.

GAVHANE, Y. Nanasahab; GURAV, A. S.; YADAV, A. V. **Chitosan and its applications: a review of literature**. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, v. 4, n. 1, p. 312-331, 2013.

GERMANO, Pedro Manuel Leal; GERMANO, Maria Izabel Simões. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 7ª ed., São Paulo, 164 p., 2014.

GOMES L.C.; DESCHAMPS, J.; BRIANDET R.; MERGULHÃO, F.J. **Impact of modified diamond-like carbon coatings on the spatial organization and disinfection of mixed-biofilms composed of Escherichia coli and Pantoea agglomerans industrial isolates**. International journal of food microbiology, v. 277, p. 74-82, 2018.

GOMES, Fellype Diorgennes Cordeiro. **Análise do controle de qualidade físico-químicas de detergentes**. Research, Society and Development, v. 9, n. 6, p. 54, 2020.

GUIMARÃES, Alécia Daila Barros; BORGES, Larissa Lorrane Rodrigues; FREITAS, Adriana Gonçalves; CARELI, Roberta Torres; DUARTE, Eduardo Robson. **Biofilmes de bactérias causadoras de mastite bovina e sua biotransferência de aço inoxidável para o leite**. In: Congresso Latino-Americano; Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos; Encontro Nacional de Vigilância de Zoonoses; Encontro do Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

HADDAD, Antonio; SESSO, Antônio; ATTIAS, Márcia; FARINA, Marcos; MEIRELLES, Maria de Nazareth; SILVEIRA, Marina; BENCHIMOL, Marlene; SOARES, Maurílio J.; BARTH, Ortrud Monika; MACHADO, Raul D.; PADRÓN, Thais Souto; SOUZA, Wanderley de. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998. Acesso em: 01 dez. 2022.

HELANDER, Ilkka. M.; NURMIAHO-LASSILA, Eeva-Liisa; AHVENAINENA, R; RHOADESC. J.; ROLO, S. **Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria**. International journal of food microbiology, v. 71, n. 2-3, p. 235-244, 2001.

HOSSEINI, Seyed Fakhreddin; ZANDI, Mojgan; REZAEI, Masoud; FARAHMANDGHAHI, Farhi. **Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study**. Carbohydrate Polymers v. 95, n. 1, p. 50-56, 2013.

IBGE. Censo Agropecuário, 2017. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 22 de ago. 2020.

IMELOUANE, B., AMHAMDI, H., WATHELET, JP, ANKIT, M., KHEDID, K., & EL BACHIRI, A. **Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (Thymus vulgaris) from Eastern Morocco**. International Journal Of Agriculture & Biology. 11: 113–118, 2009. ISSN Print: 1560–8530;

INÁCIO, Isabella Francisco. **Nanopartículas à base de excipientes naturais aplicadas como sanitizantes**. 2022. 38f. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Biotecnologia) – Universidade Federal de Uberlândia, 2022.

KUMAR, Majeti NV Ravi. **A review of chitin and chitosan applications**. *Reactive and functional polymers*, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(00\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00038-9).

LANGONI, Helio; SALINA, Anelise; OLIVEIRA, Gabriela Capriogli; JUNQUEIRA, Nathália Brancato; MENOZZI, Benedito Donizete; JOAQUIM, Sâmea Fernandes **Considerações sobre o tratamento das mastites**. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 37, p. 1261-1269, 2017.

LECETA, Itsaso; GUERRERO, Pedro; CABEZUDO, Sara; LACABAA, Koro de. **Environmental assessment of chitosan-based films**. *Journal of Cleaner Production*, v. 41, p. 312-318, 2013.

LI, Jianhui; ZHAO, Liqing; WU, Yiguang; RAJOKA, Muhammad Shahid Riaz. **Insights on the ultra high antibacterial activity of positionally substituted 2'-O-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride chitosan: A joint interaction of-NH₂ and-N⁺ (CH₃)₃ with bacterial cell wall**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 173, p. 429-436, ISSN 0927-7765. 2019.

LJU, Zonghua.; JIAO, Yanpeng.; WANG, Yifei; ZHOU, Changren.; ZHANG, Changren. **Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, n. 15, p. 1650–62, 2008.

MACEDO, Camila Avelino de. **Atividade antibacteriana e antibiofilme da *Lippia grata* frente a isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa***. 2019. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

MACÊDO, Messias Franca de. **Estudos sobre o potencial do uso de gel da associação de quitosana e fibroína para remineralização biomimética do esmalte dental em lesões de cárie produzidas in vitro**. 2022. Tese (Doutorado em Biologia Oral) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022. doi:10.11606/T.58.2022.tde-06122022-113423. Acesso em: 2022-12-11.

MARANGON, Crisiane Aparecida. **Atividade antimicrobiana e citotoxicidade de emulsões de quitosana/gelatina/óleo de copaíba**. 2015, 95f. Tese (Bioengenharia). Universidade de São Paulo, São Carlos.

MARTINS, Carla Silva; MORGADO, Daniella Lury; DE ASSIS, O. B. G. **Caracterização de filmes de goma de cajueiro e quitosana por diferentes técnicas**. In: Embrapa Instrumentação-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: JORNADA CIENTÍFICA-EMBRAPA SÃO CARLOS, 6., 2014, São Carlos, SP Anais... São Carlos: Embrapa Instrumentação: Embrapa Pecuária Sudeste, 2014. p. 60.

MASSOTE, Vitória Pereira; ZANATELI, Bruna Mariana; ALVES, Geovana Vilela; GONÇALVES, Elaine Santana; GUEDES, Elizângela. **Diagnóstico e controle de mastite bovina: uma revisão de literatura.** Revista Agroveterinária do Sul de Minas, v. 1, n. 1, p. 41-54, 2019.

MATI, Maria Leticia De Miranda. **Reutilização do detergente enzimático: avaliação do impacto da contaminação microbiana da solução na efetividade da limpeza de aparelhos endoscópicos gastrointestinais.** 2018, 93f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Enfermagem). Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Enfermagem. 2018. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/ENFC-B6KHC4/1/maria_let_cia_de_miranda_mati.pdf. Acesso em: 13 de nov. 2022).

MATICA, Mariana Adina; AACHMANN, Finn Lillelund; TØNDERVIK, Anne; SLETTA, Håvard; OSTAFE, Vasile. **Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action.** International Journal of Molecular Sciences, v. 20, n. 23, p. 5889, 2019.

MENDES, Leila Dorácio; BRESOLIN, Joana Dias; ASSIS, Odílio Benedito Garrido; BRITTO, Douglas de. **Avaliação in vitro da Ação da quitosana e de seu derivado quaternizado na inibição do crescimento do fungo Penicillium expansum.** Brazilian Journal of Biosystems Engineering, v. 10(1): 116-128, 2016.

MILLEZI, Alessandra Farias. **Ação bactericida de detergente-sanificante à base de óleos essenciais sobre biofilme de Aeromonas hydrophila.** 2009. 60 p. 69f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

MILLEZI, Alessandra Farias; CAIXETA, Danila Soares; ROSSONI, Diogo Francisco; CARDOSO, Maria das Graças; PICCOLI, Roberta Hilsdorf. **Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra Staphylococcus aureus e Escherichia coli.** Revista brasileira de plantas medicinais, v. 15, p. 373-379, 2013.

MODI, Mayank Kumar; PATTANAİK, Piyush; DASH, Nishad; SUBRAMANIAN, Sangeetha. **Sorption of radionuclides.** International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, v. 34, n. 1, p. 122-130, 2015. ISSN 0976 – 044X.

MUDUNKOTUWA, Imali A.; AL MINSHID, Alaa; GRASSIAN, Vicki H. **ATR-FTIR spectroscopy as a tool to probe surface adsorption on nanoparticles at the liquid–solid interface in environmentally and biologically relevant media.** Analyst, v. 139, n. 5, p. 870-881, 2014.

NASCIMENTO, José Augusto de Almeida. **Nanoencapsulação de vitamina C extraída de resíduo agroindustrial para preparação de filmes comestíveis.** 2018, 79f. Dissertação (Mestrado de Ciências dos Materiais) Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Juazeiro – BA, 2018.

OLIVEIRA, Carlos Magno C; SOUZA, Melina Garcia Silva; SILVA, Natália da Silva e; MENDONÇA, Carla Lima; SILVEIRA, José Alcides Sarmiento; OAIGEN, Ricardo Pedroso; BARBOSA, José Diomedes; ANDRADE, Stefano Juliano Tavares de.

Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 31, p. 104-110, 2011.

PARACAMPO, Nádia Elígia Nunes Pinto. **Fingerprinting" e análise multivariada aplicados ao estudo de identidade e qualidade de fitoproduto de ajuru (" Chrysobalanus icaco" Linnaeus.** 2017, 185 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1076335>. Acesso em: 19 de ago. 2022.

PAULO, Heloisa Delgado; BRESOLIN, Joana Dias; ASSIS, Odílio Benedito Garrido. **Avaliação da atividade antimicrobiana de coberturas de derivado hidrossolúvel de quitosana sobre brotos de feijão.** In: WORKSHOP DA REDE DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO, 9., 2017, São Carlos. Anais... São Carlos: Embrapa Instrumentação, p. 181-183. 2017.

PEIXOTO, Rodolfo de Moares; MOTA, Rinaldo Aparecido; COSTA, Mateus Matiuzzi. da. **Mastite em pequenos ruminantes no Brasil.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 30, p. 754-762, 2010.

PEREIRA, Alcilene de Abreu; CARDOSO, Maria das Graças; ABREU, Luiz Ronaldo de; MORAIS, Augusto Ramalho de; GUIMARÃES, Luiz Gustavo de Lima; SALGADO, Ana Paula Soares Pinto. **Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de Staphylococcus aureus e Escherichia coli.** Ciência e Agrotecnologia, v. 32, p. 887-893, 2008.

PEREIRA, Aline Massias. **Encapsulamento de hidrolisados proteicos de Spirulina para aplicação em alimentos.** 2020, 151 f. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2020.

PEREIRA, Gustavo; DUARTE, Dirliane Santos; BRITTO, Douglas de. **Preparação de polissacarídeos e princípios ativos antifúngicos a partir de recursos vegetais do Semiárido para revestimento de frutas.** In: Jornada de Integração Da Pós-Graduação da Embrapa Semiárido, 3; Petrolina. Anais... Petrolina: Embrapa Semiárido, 2018. p. 249-254, 2018.

PEREIRA, Renata Junqueira; CARDOSO, Maria Das Graças. **Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes.** Journal of biotechnology and biodiversity, v. 3, n. 4, 2012.

PORTO, Alice Sperandio. **Desenvolvimento de nanoemulsão a base de óleo de copaíba - Copaifera Multijuga Hayne e nanopartícula de prata associada a itraconazol e terbinafina: ensaios antimicrobianos.** 2020. 100 f., il. Tese (Doutorado em Nanociência e Nanobiotechnology)—Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

PROBST, Isabella da Silva. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico.** 2012. 102 f. Dissertação (mestrado) -

Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2012.
Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/87926>. Acesso em 20 de set. 2020.

RAFFA, Demetrio; MAGGIO, Benedetta; RAIMONDI, Maria Valeria; PLESCIA, Fabiana; DAIDONE, Giuseppe. **Recent discoveries of anticancer flavonoids**. European journal of medicinal chemistry, v. 142, p. 213-228, 2017.

RECH, Chaiane Regina; BRABES, Kelly Cristina da Silva; BUSCHINELLI DE GOES, Rafael Henrique de Tonissi ; ALIATTI, Lujan Nunes Sanabria; SILVA, Kesia Esther; **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 33, n. 1, 2015.

RODRIGUES, Gabriella Silva; SANTOS, Naiane Oliveira; FORTUNA, Jorge Luiz. **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.(CAPIM-SANTO) SOBRE *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli***. Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente, v. 10, n. 1, p. 8-8, 2020.

RODRIGUES, Naiane; DUARTE, Dirliane Santos.; SOUZA, Ana Valeria Vieira de; BRITTO, Douglas de. **Nanoencapsulamento de óleo essencial de *Lippia gracilis* para preparação de revestimento antifúngico pós-colheita**. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 13., 2018, Petrolina. Anais... Petrolina: Embrapa Semiárido, 2018. p. 249-254. Série Embrapa Semiárido. Documentos, 283.

RÚNARSSON, Ögmundur Vidar; HOLAPPA, Jukka; NEVALAINEN, Tapio; HJÁLMARSDÓTTIR, Martha; JÄRVINEN, Tomi; LOFTSSONA, Thorstein; EINARSSON, Jón M.; JÓNSDÓTTIR, Sigrídur; VALDIMARSDÓTTIRA, Margrét; MÁSSON, Már. **Antibacterial activity of methylated chitosan and chitooligomer derivatives: Synthesis and structure activity relationships**. European Polymer Journal, v. 43, n. 6, p. 2660-2671, 2007.

SANTOS, Dinamérico de Alencar; MATOS, Rodrigo Antonio; MELO, Torres Diego Barreto de; JÚNIOR, Felício Garino; SIMÕES, Sara Vilar Dantas; MIRANDA, Eldinê Gomes de. **Etiologia e sensibilidade antimicrobiana in vitro de bactérias isoladas de cabras com mastite no Sertão e Cariri paraibano**. Ciência Animal Brasileira, v. 20, 2019.

SANTOS, Yasmim Priscila Silva. 2021. f 58. **Mastite Clínica: e os princípios**. Monografia (Medicina Veterinária). AGES – Paripiranga 2021.

SCALZADONA, Natalia Belén. **Evaluación de la eficacia diferentes detergentes en la remoción de biopelículas bacterianas**. 2019, 37f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Esterilização) - Universidade Nacional de Córdoba Facultad de Ciencias Químicas Escuela de Posgrado. 2019. Disponível em: <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/12769/13410%20R-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 29 de out. 2022.

SCHALCH, Nadia Obrownick Okamoto. **Associação de nanocelulose e nanopartícula de quitosana na estabilização de ácido fólico (vitamina B9)**. 2019. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de

Materiais voltados à Agroindústria) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, University of São Paulo, Pirassununga, 2019.
doi:10.11606/D.74.2019.tde-03122019-100652. Acesso em: 2022-11-18.

SEGALA, Karen; DUTRA, Rosilene L.; OLIVEIRA, Eric N. de; JIVALDO, Rossi, Liane M.; PAULA, Marcos M. S.; FRANCO, César V. **Characterization of poly-{trans-[RuCl₂ (vpy) 4]-styrene-4-vinylpyridine} impregnated with silver nanoparticles in non aqueous medium.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 17, p. 1679-1682, 2006.

SHERRY, Mirna; CHARCOSSET, Catherine; FESSI, Hatem; GREIGE-GERGES, Hélène. **Essential oils encapsulated in liposomes: a review.** Journal of Liposome Research, v. 23, n. 4, p. 268-275, 2013. Disponível em:
<https://doi.org/10.3109/08982104.2013.819888>.

SILVA, Gilvan; DUTRA, Paulo Ricardo Santos; CADIMA, Ivan Marques. **Higiene na indústria de alimentos.** 2016. 134 f. Curso Técnico em Alimentos. Recife: EDUFRPE, 2010. ISBN: 978-85-7946-068-5

SILVA, Graziela Cláudia da. **Óleos essenciais de Hymenaea spp.: composição química e estudo ultraestrutural sobre atividade antimicrobiana em bactérias multirresistentes e Candida spp.** 2018, 104f. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2018.

SILVA, Isamara Ferreira da; GUIMARÃES, Amanda Leite; AMORIM, Vinícius Santana; SILVA, Telma Maria Guedes da; PEIXOTO, Rodolfo de Moraes; NUNES, Xirley Pereira; SILVA, Tânia Maria Sarmento; COSTA, Mateus Matiuzzi da. **Atividade antimicrobiana do extrato etanólico da Commiphora leptophloeos (Mart.) JB Gillett frente a Staphylococcus spp. isolados de casos de mastite em ruminantes.** Ciência Animal Brasileira, v. 20, 2019.

SILVA, Jéssica Montenegro Santana da. **Encapsulamento do óleo essencial da Lippia alba em nanopartículas de poli-ε-caprolactona (PCL) para avaliação da estabilidade e atividade larvicida contra o Aedes aegypti.** 2019. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019. Disponível em:
<https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/7220>. Acesso em: 19 de set. 2020.

SILVA, Leandro Prezotto da. **Avaliação da atividade antimicrobiana da N,N,N-trimetil quitosana e da quitosana comercial sobre o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas e de fungos filamentosos.** 2014. 83 f. Dissertação (Mestrado em Multidisciplinar) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/7036>. Acesso em: 20 de set. 2020.

SILVA, Mariama Tomaz Nogueira da; USHIMARU, Priscila Ikeda; BARBOSA, Luciano; CUNHA, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da; FERNANDES JUNIOR, Ary. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de Staphylococcus aureus e Escherichia coli isoladas de casos clínicos humanos.** Revista brasileira de plantas medicinais, v. 11, p. 257-262, 2009.

SOBREIRA, Thamy Gomes Pacheco; SILVA, Lindomar Avelino da; MENEZES, Frederico Duarte de; FRANÇA, Elvis Joacir de; AQUINO, Kátia Aparecida da Silva. **Aspectos estruturais de esferas de quitosana/PVA reticuladas com glutaraldeído submetidas a diferentes tratamentos térmicos.** Química Nova, v. 43, p. 1251-1257, 2020.

SOLIMAN, M.K.; ELLAKANY, H.F.; GAAFAR, A.Y; ELBIALY, A.K.1 ; ZAKI, M.S; YOUNES, A.M . **Epidemiology and antimicrobial activity of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from Nile tilapia (Oreochromis niloticus) during an outbreak in Egypt.** Life Science Journal, v. 11, n. 10, p. 1245-1252, 2014.

SOUSA JÚNIOR, Dárcio Luiz de; CORDEIRO, Paula Patrícia Marques; BARBOSA, Cristina Rodrigues dos Santos; MUNIZ, Débora Feitosa; SILVEIRA, Zildene de Sousa; MACÊDO, Nair Silva; LACERDA NETO, Luiz Jardelino de; FREITAS, Thiago Sampaio de; SANTOS, Joycy Francely Sampaio dos; COUTINHO, Henrique Douglas Melo; OLIVEIRA, Lígia Cláudia Castro de; CUNHA, Francisco Assis Bezerra da. **Evaluation of isoeugenol in inhibition of Staphylococcus aureus efflux pumps and their toxicity using Drosophila melanogaster model.** Life Sciences, v. 285, p. 119940, 2021.

SOUZA, Ana Valéria Vieira de. **Extração de óleo essencial de alecrim-do-mato (Lippia grata Schauer–Verbenaceae).** Embrapa Semiárido-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2021.

SOUZA, Ana Valeria Vieira de; KIILL, Lucia Helena Piedade. **Como produzir mudas de alecrim-do-mato (Lippia grata Schauer Verbenaceae).** Comunicado Técnico (Embrapa Semiárido. Instruções Técnicas, 133). p 14. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2018.

SOUZA, Evandro Leite. **Potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano (Origanum vulgare L.): Uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos.** 2006. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

SOUZA, José Victor Lessa de; NOVAES, Gabriel de Carvalho; LUCENA, Leandro Ricardo Rodrigues de; LEITE, Mauricio Luiz de Mello Vieira. **Caracterização do consumo das carnes caprina e ovina em Floresta – PE.** In: II Congresso Internacional das Ciências Agrárias COINTER – PDVAgro. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Taclada (UFRPE-UAST). 2017

SUFFREDINI, Ivana Barbosa; VARELLA, Antonio Drauzio; YOUNES, Riad Naim. **Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de três extratos vegetais antibacterianos selecionados da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica brasileiras.** Revista Instituto Ciência Saúde, v. 25, n. 2, p. 127-9, 2007.

TAVARES, Guilherme Diniz. **Nanopartículas de poli (n-butil-cianoacrilato) revestidas com N,N,N,-trimetilquitosana: desenvolvimento, caracterização e estudos de permeabilidade in vitro.** 2013. Tese (Doutorado em Produção e

Controle Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, University of São Paulo, São Paulo, 2013. doi:10.11606/T.9.2013.tde-22052013-143948. Acesso em: 2022-11-17.

THEVES, Anderson. **Elaboração de detergente sem adição de trietanolamina 85%**. 2017, 30f, Relatório técnico (Curso técnico em Química) do Centro Universitario Univates, Lajeado. 2017. Disponível em: https://www.univates.br/tecnicos/media/artigos/Elaboracao_de_Detergente_sem_Adiacao_de_Trietanolamina_85_2017-A.pdf. Acesso em: 18 de nov.2022.

TRENTIN, Bianca Cristina. **Indicação de melhorias na qualidade de detergentes com base na expectativa de consumidores do produto**. 2016 57f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Produção). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2016.

TREVISAN, Maria Teresa Salles; MARQUÊS, Ricardo de Araújo; SILVA, Maria Goretti de Vasconcelos; SCHERER, Dominique; HAUBNER, Roswitha. **Composition of essential oils and ethanol extracts of the leaves of Lippia species: identification, quantitation and antioxidant capacity**. Records of Natural Products, v. 10, n. 4, p. 485, 2016.

TRIFAN, A.; LUCA, S. V.; GREIGE-GERGES, H.; MIRON, A.; GILLE, E.; APROSTOSOAI, A. C. **Recent advances in tackling microbial multidrug resistance with essential oils: combinatorial and nano-based strategies**. Critical Reviews in Microbiology, v. 46, n. 3, p. 338–357, 2020.

UGARTE, Sheila Dayanna Milan. **Atividade antimicrobiana da cobertura comestível de quitosana adicionada com trans-cinamaldeído sobre Escherichia coli E Listeria innocua em melão cantaloupe (Cucumis melo, L.) minimamente processado**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia e Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

WANG, Wenqian; MENG, Qiuyu; LI, Qi; LIU, Jinbao; ZHOU, Mo; JIN, Zheng; ZHAO, Kai. **Chitosan derivatives and their application in biomedicine**. International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 2, p. 487, 2020.

YU, Qingjiang; WANG, Yinghui; YI, Zhihui; ZU, Ningning; ZHANG, Jing; ZHANG, Min; WANG, Peng. **High-efficiency dye-sensitized solar cells: the influence of lithium ions on exciton dissociation, charge recombination, and surface states**. ACS nano, v. 4, n. 10, p. 6032-6038, 2010.

ZHANG, J. J.; TAN, W.Q.; LUAN, F.; YIN, X. L.; DONG, F.; LI, Q.; GUO, Z. Y. **Synthesis of quaternary ammonium salts of chitosan bearing halogenated acetate for antifungal and antibacterial activities**. Polymers v.10, n. 5, 2018.