



OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRÓPOLIS E SEU EFEITO ANTIMICROBIANO

DA SILVA, S. R.^{1,2}; RAPOSO, N. R. B.¹; LANGE, C. C.²; GERN, J. C.; BRANDI, R. R.²; MATTOSO L. H. C.³; RIBEIRO, C.³; BRANDÃO, H. M.^{2*}

¹ Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil

² Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil

³ Embrapa Instrumentação Agrícola, São Carlos, SP, Brasil

*e-mail: humberto@cnpagl.embrapa.br

Projeto Componente: PC5

Plano de Ação: PA6 e PA2

Resumo

O interesse em produtos naturais para produção de nanopartículas aumenta consideravelmente a cada ano, principalmente, no campo biomédico devido a suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade. Neste contexto, a própolis despertou atenção por suas características farmacológicas e por não ser um material estranho para a população. O objetivo desse trabalho foi nanoestruturar o extrato da própolis e avaliar a atividade antibacteriana de nanopartículas de própolis com diferentes tamanhos. Pode-se observar a formação de nanopartículas de própolis e um discreto aumento de sua atividade antimicrobiana em função da redução de seu tamanho.

Palavras-chave: nanopartículas, própolis, antimicrobiano

Introdução

A manipulação de materiais em nanoescala é de grande interesse para diversas áreas do conhecimento, em especial as associadas à indústria de alimentos, biomédicos e cosméticos [1].

Materiais nanoestruturados podem apresentar novas características como, por exemplo, melhor biodistribuição e maior atividade biológica, [2]. Neste contexto, o uso de produtos naturais como alternativa para a confecção de nanomateriais da área biomédica ganhou destaque, basicamente por suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade [1].

Como uma alternativa de material natural para nanoestruturação, nossa equipe, identificou a própolis como de grande potencial, basicamente por suas reconhecidas ações farmacológicas e tradicional uso na medicina popular e fitoterápica humana e animal. Nesse contexto, o presente estudo objetivou produzir e avaliar a atividade antimicrobiana de nanopartículas de própolis.

Materiais e métodos

De acordo com metodologia previamente descrita por Brandão e colaboradores [3], foram produzidas nanopartículas com dois tamanhos. No primeiro tratamento, preparou-se extrato alcoólico de própolis em concentração de 2,75% (m/v), enquanto que no segundo tratamento as partículas foram preparada a partir de um extrato alcoólico de própolis na concentração de 0,5% (m/v), ambos os tratamentos foram previamente filtrados em filtros de nylon de 0,22 micrômetros.

Em seguida, separadamente, gotejou-se lentamente 1 mL do extrato da própolis em 5 mL de uma solução aquosa de álcool polivinílico a 0,3% (m/v) sob agitação constante de 600 rpm por 15 minutos a 35°C.

O tamanho médio, o índice de polidispersão e o potencial Zeta das nanopartículas formadas nos dois tratamentos foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer NANO ZS, Malvern Instruments Limited).

As concentrações de própolis nas duas formulações foram ajustadas para 2048 µg/mL e o efeito bactericida foi determinado *in vitro* contra amostras de *Staphylococcus aureus* (estirpe ATCC23273) cultivadas em caldo Mueller Hinton.

Resultados e discussão

As nanopartículas produzidas no primeiro tratamento (2,75% m/v) apresentaram diâmetro médio de 380,4 nm, índice e polidispersão de 0,197 e potencial Zeta de -22,9 mV. Por sua vez, o segundo tratamento (0,5% m/v), apresentou partículas com diâmetro médio de 380,4 nm, índice de polidispersão de 0,065 e potencial Zeta = -38,3 mV.

A diferença no tamanho das partículas pode ser atribuída à concentração da própolis no extrato alcoólico, que com o aumento da matéria seca também tem sua viscosidade aumentada e sua relação solvente/própolis modificada. Em viscosidades mais elevadas, o processo de migração do solvente para o contra solvente é mais lento e, por consequência “fragmentação” do solvente para a fase aquosa é menos intensa, formando portanto partículas maiores.

As nanopartículas de própolis com menor diâmetro apresentaram atividade antibacteriana discretamente superior quando comparadas às maiores, necessitando respectivamente de 256 µg/mL e 512 µg/mL de nanopartículas para inibir o crescimento de amostra de *Staphylococcus aureus*, ATCC23273 (tabela 1).

Tabela 1: Eficiência bactericida (*Staphylococcus aureus*, estirpe ATCC23273) de suspensão aquosa de nanopartículas de própolis com diâmetro médio de 380,4 nm e 250 nm.

Diluições (µg/mL)	Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i>	
	NP 380,4 nm	NP 250 nm
32	+	+
64	+	+
128	+	+
256	+	-
512	-	-
1024	-	-
2048	-	-

NP = nanopartícula

Possivelmente, a diferença na atividade antimicrobiana entre os tratamentos pode ser atribuída a mudanças na relação área/superfície [4], nessas condições partículas menores podem apresentar uma área de contato superior com as

bactérias e, por isso, os componentes ativos da própolis atuar de forma mais intensa sobre as bactérias no meio de cultura. Entretanto a redução de um único fator de diluição é apenas um indicativo de maior atividade, demandando, portanto, uma redução ainda maior no tamanho das partículas para se confirmar tal hipótese.

Conclusões

Conseguiu-se com sucesso produzir nanopartículas de própolis, adicionalmente, a redução de tamanho indica ser possível aumentar a sua atividade antimicrobiana, todavia mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Agradecimentos

CNPQ, CAPES, FINEP, FAPEMIG, EMBRAPA, Rede AGRONANO

Referências

1. M. R. Moura; F. A. Aouada; L. H. C. Mattoso *J. Colloid Interf. Sci.* 2008, 321, 477.
2. W. H. Suh; K. S. Suslick; G. D. Stulicky; Y. Suh *Prog. Neurobiol.* 2009, 87, 133.
3. H. M. Brandão; B. M. M. Vinholis; C. V. Mosqueira; C. H. L. Mattoso; M. A. V. P. Ribeiro; V. R. Sousa; R. N. Barbosa; C. C. Lange.; BR PI 1004808-1, 2010.
4. A. J. G. Zarbin, *Química Nova* 2007, 30, 6, 1469.



TESTE *IN VIVO* DE UMA FORMULAÇÃO NANOESTRUTURADA PARA CONTROLE DA MASTITE BOVINA

ARAÚJO, R. S.¹; MOSQUEIRA, V. C. F.¹; BRITO, M. A. V. P.²; GUIMARÃES, A. S.²; LANGE, C. C.²; GERN, J. C.²; BRANDÃO, H. M.^{2*}

¹ Universidade Federal de Ouro Preto, MG, Brasil

² Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil

*e-mail de contato; humberto@cnpgl.embrapa.br

Projeto Componente: PC5

Plano de Ação: PA6 e PA 2

Resumo

A mastite figura como uma das doenças que mais causam prejuízo econômicos em rebanhos leiteiros. Seu tratamento consiste de antibioticoterapia pela via parenteral ou intramamária, sendo esta mais eficiente. Entretanto, os casos de insucesso terapêutico são frequentes. Para contornar esta limitação, este trabalho objetivou avaliar o potencial uso de uma formulação nanoestruturada de antibiótico para o tratamento da mastite de bovinos leiteiros. Para tanto, doze quartos mamários de vacas na fase de secagem foram tratados com 600mg de cloxacilina nanoestruturada pela via intramamária. A formulação apresentou tanto efeito curativo nos quartos mamários infectados, quanto efeito preventivo nos saudáveis, indicando, portanto, seu uso promissor para o controle dessa infecção.

Palavras-chave: Mastite, bovino, nanopartículas, cloxacilina

Introdução

A mastite bovina provoca perdas econômicas em todos os segmentos da cadeia produtiva do leite, reduzindo a produtividade, aumentando o custo de produção, o número de células somáticas e diminuindo a qualidade do leite [1]. Dentro de um sistema produtivo, tais consequências resultam em menor remuneração, decorrente em parte, dos sistemas atuais de pagamento adotados pela maioria das empresas compradoras [2]. Em adição, as alterações físico-químicas do leite proveniente de animais com mastite, provocam queda de rendimento industrial, problemas de processamento e produtos industrializados mais instáveis e de pior qualidade [2].

Uma gama muito grande de micro-organismos pode causar mastite, mas pela frequência com que

são isolados, o *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* são considerados os mais importantes [3].

Para o tratamento e para a prevenção de novas infecções por esses patógenos é preconizada a terapia de vaca seca, que consiste na infusão intramamária de formulações de longa ação contendo antibiótico no momento da secagem (*i.e.* 45-60 dias antes do parto). Todavia, recidivas são frequentes após a terapia, principalmente quando os patógenos conseguem se subcompartmentalizar no interior de abscessos, células epiteliais, células fagocitárias, alvéolos e ductos obstruídos por coágulos, os quais dificultam a difusão do antibiótico[1].

No intuito de contornar tal limitação, nossa equipe desenvolveu uma formulação intramamária

contendo nanocápsulas capazes de direcionar o antibiótico para a superfície do epitélio glandular e para o interior de células fagocitárias.

Neste contexto, objetivou-se avaliar clinicamente o uso intramamário de nanocápsulas contendo cloxacilina para o tratamento de vacas contendo quartos mamários saudáveis e naturalmente infectados com patógenos causadores de mastite.

Material e métodos

Nanocápsulas contendo cloxacilina foram preparadas pela técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado, seguida de evaporação do solvente, segundo metodologia previamente descrita por [4].

O tamanho médio e índice de polidispersão (IPD) da partículas foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons a 20°C em um Nanosizer N5Plus Analyser, Beckmann Coulter (Fullerton, USA), enquanto que o potencial Zeta foi determinado por anemometria laser Doppler em um Zetasizer HS3000 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

A determinação do estado sanitário do quarto mamário foi determinado por intermédio de três isolamentos bacterianos intervalados de dez dias e por três exames de isolamento bacteriano no pós parto respeitando o mesmo intervalo [5,6]. Considerou-se quarto mamário infectado aquele que apresentou pelo menos dois isolamentos de um mesmo patógeno.

Resultados e discussão

As nanocápsulas contendo cloxacilina infundidas na glândulas mamárias apresentaram diâmetro médio de 322nm e uma baixa polidispersão, com IPD de 0,088. O potencial Zeta foi estimado em -28mV, indicando que as partículas podem ser estáveis em suspensão aquosa por repulsão eletrostática, uma vez que o módulo do potencial Zeta encontra-se muito próximo de 30mV [7].

Nos quartos mamários infectados foram isolados *Corynebacterium sp.* (03), *Staphylococcus coagulase negativo* (02) e *Streptococcus uberis* (01) que, quando tratados, tornaram-se livres de patógenos (Tabela 1). Por sua vez, os quartos mamários que se apresentavam livres de bactérias patogênicas permaneceram saudáveis durante o período experimental. Tais resultados indicam que o sistema nanoparticulado empregado no experimento

apresentou tanto efeito curativo quanto preventivo para os bovinos.

Tabela 1. Status microbiológico de quartos mamários tratados com 600mg de cloxacilina nanoencapsulada.

Quartos mamários	Pré tratamento		Pós parto	
	neg	pos	neg	pos
Com mastite	-	06	06	-
Sem mastite	06	-	06	-

O período próximo ao parto, marcado pela fase de secagem e pelos primeiros 30 dias de lactação, é responsável pela maior incidência de novas infecções na glândula mamária. Isso ocorre em função da maior vulnerabilidade glandular, que pode apresentar falhas na manutenção do tampão queratinoso no óstio do teto e redução da capacidade de resposta imunológica da glândula mamária [8]. Por consequência, uma boa formulação antimastite deve exercer efeito curativo e preventivo quando aplicada no momento da secagem [9].

Conclusões

Os resultados encontrados, embora preliminares, sinalizam o uso promissor da cloxacilina nanoencapsulada na terapia de vaca seca. Ainda, para confirmar estes achados e conferir segurança de seu uso, o número de animais tratados deve ser ampliado.

Agradecimentos

À EMBRAPA, CNPq, FINEP, CAPES, Rede AgroNano, FAPEMIG e Rede NAOBIOMG.

Referências

1. R. Gehring; G. W. Smith *J. Vet. Pharm. and Therap.* 2006, 29, 237.
2. P. C. Martins *Os extremos do leite*, in: *Cadeia produtiva do leite*, Embrapa Ed.; Juiz de Fora, 2005; 204.
3. R. J. Harmon *J. Dairy Sci.*, 1994, 77, 2103.
4. V. C. F. Mosqueira; R. S. Araujo; H. M. Brandao US Patent. WO 2011150481, 2011.
5. NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Wayne: NCCLS, Document M31-T, 1997, 64.
6. M. A. V. P. Brito; J. R. F. Brito; M. A. S. Sila; R. A. Caro *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, 2001, 53, 531.
7. C. P. Reis; R. J. Neufeld; A. J. Ribeiro; F. Veiga *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.*, 2006, 2, 8.
8. B. A. Mallard; J. C. Dekkers; M. J. Ireland; K. E. Leslie; S. Sharif *J. Dairy Sci.*, 1998, 81, 585.