

DESENVOLVIMENTO DE NANOFORMULAÇÃO CONTENDO EXTRATO DE CASCA DE OLEAGINOSA E EFEITO ANTIMICROBIANO SOBRE BACTÉRIAS ISOLADAS DO CONDUTO AUDITIVO DE CÃES ACOMETIDOS POR OTITE EXTERNA.

ANA CLARA MARTINS MARIANO ^{1,2*}, EMILY SANTOS RODRIGUES³,
ANDRESSA BEACHER⁴, BRUNA ALVES OTTOBELI⁵, KATHARINE
MARGARITHA⁶, LINCOLN GONÇALVES MARCILIO⁷, FERNANDA DE
OLIVEIRA LIMA⁸, LETIÉRE CABREIRA SOARES⁹, DALILA MOTER
BENVEGNÚ^{2,10}

1 Introdução

A otite externa é caracterizada como um processo inflamatório que acomete o conduto auditivo dos cães, sobretudo a porção externa. Esta enfermidade pode ser causada por agentes infecciosos, como bactérias e fungos (Garcia, 2019). Porém, o uso indiscriminado de antibióticos, na tentativa de tratar essa doença, tem contribuído para a seleção de cepas bacterianas resistentes aos medicamentos (Corrêa, 2018).

A utilização de produtos fitoterápicos juntamente com a nanotecnologia com o objetivo de reduzir efeitos adversos à saúde humana e animal e prevenir a resistência microbiana, vem se

1 Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Realeza*, contato: ana.mariano@estudante.uffs.edu.br.

2 Grupo de Pesquisa: Saúde, Produção e Reprodução Animal – GPqPRA.

3 Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Realeza*, contato: emily.rodrigues@estudante.uffs.edu.br.

4 Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Realeza*, contato: andrssa.beacher@estudante.uffs.edu.br

5 Mestranda em Saúde e Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul, Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Realeza*, contato: bruna.ottobeli@uffs.edu.br.

6 Mestranda em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, *Campus São Paulo*, contato: ksatiro@gmail.com

7 Acadêmico de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Realeza*, contato: lincoln.marcilio@estudante.uffs.edu.br

8 Doutora em Química Analítica, Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Realeza*, contato: Fernanda.soares@uffs.edu.br.

9 Doutor em Química Orgânica, Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Realeza*, contato: letiere.soares@uffs.edu.br.

10 Doutora em Farmacologia, UFFS, *Campus Realeza*. **Orientador(a)**, contato: dalila.benvegnu@uffs.edu.br

tornando uma alternativa promissora (Brito et al., 2021). A nanotecnologia tem como propriedade conferir estabilidade aos ativos e aprimorar sua ação, uma vez que quando incorporados em nanopartículas tornam-se protegidos das degradações do próprio organismo, além de serem liberados de forma mais sustentada (Lazzaretti, Hupffer, 2019).

2 Objetivos

Avaliar a atividade antibacteriana de nanoformulação contendo extrato da casca de noz-pecã em bactérias isoladas do conduto auditivo de cães acometidos por otite externa.

3 Metodologia

O projeto foi cadastrado na plataforma eletrônica do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN). As cascas de noz-pecã foram doadas pela empresa Divinut, localizada em Cachoeira do Sul – RS, Brasil.

A extração foi realizada no Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Realeza, seguindo o método descrito por Amaral et al. (2019), com adaptações na concentração do extrato. Inicialmente, as cascas foram lavadas, secas em estufa a 40 °C por 12 horas, trituradas em moinho de facas e peneiradas em malha de 3 mm, obtendo partículas de tamanho uniforme.

Para a extração, 25 g de pó de casca de noz-pecã e 250 mL de solvente foram levados no equipamento Soxhlet. Foram preparados extratos com diferentes solventes extrato aquoso (250 mL de água destilada) e extrato hidroalcoólico (125 mL de água + 125 mL de etanol). A extração foi realizada durante o tempo de 4 horas, seguindo um padrão entre os dois extratos de aproximadamente 60 gotas/minuto. Ao final da extração foi ajustado o nível do líquido evaporado para 250 mL novamente. Os extratos foram armazenados em frascos âmbar para posterior nanoformulação.

Na sequência foi preparada a nanoformulação. Primeiramente foi produzida a fase aquosa da nanoformulação, dissolveu-se 0,2 g de acetato de polivinila (PVA) em 100 mL de água destilada, sob agitação magnética. Na fase orgânica, 50 mg de policaprolactona (PCL) foram dissolvidos manualmente, em 1,8 mL de diclorometano. Por fim, em outro béquer, adicionou-se 10 µL de um dos extratos a 0,5 mL de diclorometano, para dissolver o extrato.

Misturando-se à solução de PCL. A emulsão foi formada gotejando-se essa mistura em 4 mL da fase aquosa sob sonicação (70% de amplitude, 1 ciclo), durante 5 minutos (1 min ligado/30 s desligado). Procedeu-se da mesma forma para ambos os extratos e para a formulação controle (nano branca, sem extrato).

Para a realização das análises microbianas, amostras bacterianas foram obtidas de 20 cães diagnosticados com otite externa e armazenadas no Laboratório 309 da UFFS. As bactérias foram inoculadas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) e padronizadas em solução salina estéril com auxílio de espectrofotômetro (Rayleigh UV-1800 UV-Vis, 605 nm), ajustando-se para absorbância entre 0,08 e 0,13 Å.

O teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizado por microdiluição em placas de 96 poços, em triplicata. Em cada poço, adicionou-se 180 µL de caldo *Mueller-Hinton* (MH), 20 µL de extrato no primeiro poço é realizada a diluição seriada (100 µL) para os demais, seguida da adição de 10 µL de bactéria em cada um dos poços. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e lidas em leitora de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific, 625 nm).

Para a confirmação da CIM, adicionou-se 15 µL de resazurina em cada poço, incubando-se por 1 hora. Dessa forma, foi possível observar qual poço continha a maior concentração de extrato capaz de inibir a bactéria. Em seguida, para o teste de Concentração Bactericida Mínima (CBM), com o auxílio de uma alça de platina, o conteúdo foi semeado em placas de ágar *Mueller-Hinton*, incubadas a 37 °C por 24 horas, para confirmação da ausência de crescimento bacteriano.

Os dados foram tabulados em Microsoft Excel (última versão) e analisados no Software JASP 0.19. Inicialmente foram realizadas análises descritivas de frequência absoluta e percentagem. Na sequência, as variáveis categóricas foram submetidas ao teste de Qui-quadrado de Pearson. Foi adotado um valor de $p < 0,05$ como diferença estatística significativa.

4 Resultados e Discussão

Nos testes de CIM, tanto o extrato hidroalcolólico quanto o aquoso apresentaram elevada taxa de resposta positiva, correspondendo a 85% e 90%, respectivamente com diferenças significativas entre as formulações ($\chi^2=49,8$; gl=3; $p < 0,001$). Resultados semelhantes foram

descritos por Garda et al. (2021) para extrato hidroalcoólico de casca de noz-pecã em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina, e por Caxambú et al. (2016) em análises com extratos aquosos aplicados a alimentos.

Segundo Durvec et al. (2025) e Bouaouina et al. (2022), nanocarreadores, como nanocápsulas, protegem compostos instáveis, aumentam a solubilidade e permitem liberação controlada, potencializando o contato com a membrana bacteriana e resultando em menores CIM. Dessa forma, esses resultados corroboram com o presente estudo, visto que o extrato hidroalcoólico nanoencapsulado apresentou atividade em 20% dos casos (4 cepas) nos quais o extrato livre não se mostrou eficaz.

Entretanto, para o extrato aquoso nanoencapsulado, não houve atividade inibitória detectada, sendo compatível com observações de Rahmani et al. (2024), que observa o fato de que para alguns óleos e extratos a forma livre apresenta melhor desempenho que a nanoencapsulada, especialmente no que tange a efeitos *in vitro*, como no caso do presente estudo.

Nos testes de CBM, as formulações livres, tanto aquosa quanto hidroalcoólica, apresentaram desempenho superior, com exceção do extrato hidroalcoólico nanoencapsulado que inibiu 3 cepas que o extrato livre não foi capaz de inibir. O fato de a formulação livre apresentar uma melhor resposta pode ser ocasionado pelo aumento na disponibilidade imediata do composto volátil, o que favorece sua ação direta enquanto em sistema encapsulado pode ter uma alteração química durante a formulação e a eficiência da liberação do composto pode ser reduzida (Yilmaz, 2020). Esse fenômeno é consistente com relatos de que compostos voláteis podem ser retidos ou liberados de forma controlada conforme a natureza da matriz encapsulante, o que poderia ser sugestivo de algumas nanopartículas demonstrarem efeito e outras não (Marquez, 2010).

5 Conclusão

Considerando os resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que, os extratos de casca de noz-pecã possuem atividade antibacteriana promissoras contra bactérias isoladas de cães com otite externa, especialmente na forma hidroalcoólica livre. Embora a nanoencapsulação possa aumentar a estabilidade e controlar a liberação de compostos bioativos, neste estudo observou-se que para a maioria das cepas testadas, as formulações livres foram mais eficazes. A forma nanoencapsulada apresentou resultados promissores apenas para

o extrato hidroalcoólico em alguns isolados. Esses achados reforçam o potencial do extrato de noz-pecã como alternativa fitoterápica no tratamento de infecções bacterianas, porém mais estudos devem ser delineados, a fim de explorar diferentes técnicas de encapsulação e solventes.

Referências Bibliográficas

BOUAOUINA, S. et al. Effect of nanoencapsulation on the antimicrobial and antibiofilm activities of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. against multidrug-resistant clinical isolates. **Nanomaterials, Basel**, v. 12, n. 15, p. 2630, 2022.

BRITO, R. S. A. et al. Avaliação de extratos vegetais em formulações farmacêuticas no tratamento da otite externa canina. **Medicina Veterinária, Recife**, v. 15, n. 4, p. 332-339, 2021.

CORRÊA, L. Atividade antimicrobiana de extrato hidroalcoólico da casca de noz-pecã *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch. 2018.

FINDIK, F. Nanomaterials and their applications. **Periodicals of Engineering and Natural Sciences**, v. 9, n. 3, p. 62-75, 2021.

GARCIA, W. J.; FREITAS, E. S. Caracterização de resistência e sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em otite externa de cães. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG**, v. 2, n. 2, 2019.

MARQUES, Helena Ma Cabral. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and fragrance journal**, v. 25, n. 5, p. 313-326, 2010.

RAHMANI, Z. et al. Nanoemulsion and nanoencapsulation of a hydroethanolic extract of Nettle (*Urtica dioica*) and Wormwood (*Artemisia absinthium*): comparison of antibacterial and anticancer activity. **Frontiers in Chemistry**, v. 12, p. 1266573, 2024.

YILMAZ, H. A. Antibacterial activity of chitosan-based systems. In: Functional Chitosan. 2020. p. 457-489.

Palavras-chave: Inflamação, Resistência, Noz-Pecã.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2024 - 0318

Financiamento:

