

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOFORMULAÇÃO CONTENDO
EXTRATO DE *Aloysia gratissima* CONTRA CEPAS DE *Staphylococcus aureus*
ISOLADAS DE CASOS DE MASTITE BOVINA**

**EMILY SANTOS RODRIGUES^{1,2*}, ANA CLARA MARTINS MARIANO³, EMYLE
FERREIRA FLORENTINO³, OTHAVIO HENRIQUE MAIER GIACOMET³,
DANIELE CAMILA HIERT³, FERNANDA OLIVEIRA LIMA⁴, LETIÉRE
CABREIRA SOARES⁵, DALILA MOTER BENVEGNÚ⁶**

1 Introdução

A mastite bovina é uma das principais afecções que acomete as produções leiteiras, caracterizando-se como uma inflamação na glândula mamária desencadeada por diferentes fatores, sendo a de origem bacteriana a mais habitual. Entre os principais agentes etiológicos destaca-se o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. e *Escherichia coli* (Gouveia, 2022). Esse processo além de causar prejuízos econômicos aos produtores, devido a redução da produção e da qualidade do leite, também colabora para um maior índice de resistência microbiológica devido ao uso inadequado dos fármacos antimicrobianos (Scatamburlo, 2025).

A nanotecnologia é uma ferramenta atual que vem crescendo no ramo científico por ter uma ampla gama de vantagens e aplicações nos sistemas de administração de fármacos a partir de nanopartículas, visto que, possuem propriedades para estabilizar ativos e aprimorar sua ação. Além disso, seu uso juntamente com a fitoterapia são alternativas promissoras na prevenção da resistência microbiana, uma vez que existe uma grande diversidade de princípios ativos oriundos de plantas, com potencial terapêutico (Tomanić, 2023).

Entre as espécies vegetais de interesse, destaca-se a *Aloysia gratissima*, nativa da América e utilizada popularmente em diferentes tipos de afecções. Possui em sua composição princípios ativos que apresentam efeitos anti-inflamatórios e antibacterianos (Souza, 2022). Diante disso, seu uso como extrato veiculado por um sistema nanoestruturado pode ser útil no controle antimicrobiano, auxiliando na redução da enfermidade da mastite bovina.

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

2 Grupo de Pesquisa: Saúde, diagnóstico e bem-estar animal na Fronteira Sul - SADBEM

3 Acadêmica(o) de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Realeza.

4 Doutora em Química Analítica, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Realeza.

5 Doutora em Química Orgânica, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Realeza.

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

2 Objetivos

Desenvolver uma nanoformulação contendo extrato de *Aloysia gratissima*, verificar sua toxicidade e seu efeito antimicrobiano sobre bactérias isoladas da glândula mamária de bovinos leiteiros.

3 Metodologia

As folhas de *Aloysia gratissima* foram coletadas no município de Uruguaiana, Rio Grande do Sul. A planta foi seca na sombra em temperatura ambiente por 1 semana. Após esse período, foram armazenadas a uma temperatura de -4°C . A produção dos extratos foi realizada pelo método de hidrodestilação, utilizando como método de delineamento um arranjo fatorial triplo ($3 \times 3 \times 3$), resultando na obtenção de 27 tipos diferentes de extratos. O primeiro fator considerado foi o solvente: etanol, água e água+etanol (hidroalcoólico). O segundo fator foi a concentração: 1, 3 e 5 g%, correspondendo às concentrações de 10, 30 e 50 mg/mL. O terceiro fator foi o tempo de extração, correspondendo aos tempos de 15, 30 e 60 minutos.

Na sequência foi realizado o teste da CIM pelo método de microdiluição em placa (CLSI, 2008), na qual testou todos os extratos em triplicata a partir da adição de 100 μL de caldo *Mueller Hinton* (MH), 100 μL de extrato nos primeiros poços, na qual sucedeu a diluição seriada para os demais, seguida da adição 10 μL de bactéria. Após isso, as placas foram incubadas e depois lidas na leitora de microplacas. Ao total foram testadas 10 cepas bacterianas de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina, cedidas pela USP.

Para a confirmação da CIM, foi adicionado 15 μL de resazurina em todos os poços da microplaca, incubando-se novamente. Devido a sua função, foi possível observar qual poço inibia a bactéria pela menor quantidade de extrato possível. Após isso, procedeu-se com a CBM, com o auxílio de uma alça de platina, o conteúdo dos poços foi semeado para placas de Petri e incubadas para confirmação da ausência de crescimento bacteriano.

Para a avaliação do biofilme, foram selecionados os 3 melhores resultados dos testes anteriores para definir as concentrações dos componentes. As cepas foram cultivadas, padronizadas e adicionadas às microplacas contendo TSB com 1% de glicose e os extratos, em triplicata, seguindo a metodologia de Notcovich et al, (2018). Para verificar a capacidade do extrato erradicar o biofilme já formado, o teste foi refeito, com a modificação de que o extrato só foi adicionado após a incubação da microplaca por 24 horas.

Os testes de toxicidade foram realizados por meio da coleta de sangue da própria

pesquisadora. As amostras foram centrifugadas para a retirada do plasma e as hemácias foram lavadas com solução salina. Após isso, foi preparada a suspensão de 10% de hemácias, a qual foi tratada com o extrato de *Aloysia gratissima*, na concentração de 1, 3 e 5 gramas com os solventes etanol, água e o hidroalcoólico, e também, os controles positivo (água) e negativo (salina). Foram incubados e centrifugadas novamente e transferidas para uma microplaca para serem lidas em uma absorvância de 540 nm.

As nanocápsulas foram preparadas pela deposição interfacial de polímero pré-formado, conforme descrito por Fessi et al., (1989). Preparou-se a fase orgânica e a fase aquosa utilizando o agitador magnético. Após isso, a fase orgânica foi adicionada sobre a fase aquosa, permanecendo sob agitação, promovendo a formação das nanopartículas. Ao final, o solvente foi removido por evaporador rotatório. As nanocápsulas foram preparadas na concentração de 0,29 mg/mL.

4 Resultados e Discussão

Os resultados demonstraram que os extratos de *Aloysia gratissima* obtidos a partir de etanol apresentaram uma CIM e CBM menor comparado aos outros solventes, aquoso e hidroalcoólico, indicando uma ação antimicrobiana maior contra isolados de mastite bovina. Esses achados demonstram que o tipo de solvente é um fator que influencia diretamente a atividade microbiológica, fato confirmado pela análise de Kruskal-Wallis, que demonstrou diferença significativa entre os solventes, tanto para na CIM ($p < 0,001$) quanto para a CBM ($p < 0,001$).

Os resultados obtidos corroboram com o estudo de Santos et. al. (2013), visto que observaram atividades antimicrobianas em óleos essenciais da mesma espécie de planta utilizando também suas folhas, porém os testes nas flores, notou-se uma maior eficiência. Esse efeito foi atribuído aos compostos da planta, principalmente pelos sesquiterpenos.

Na avaliação do biofilme utilizando o extrato etanólico, o tempo de extração não apresentou influência significativa ($\chi^2 = 3,78$; $p = 0,151$). Já na avaliação de erradicação, com o biofilme pré-formado os resultados obtidos foram menores, variando de 2,32% a 10,3% em média, porém o tempo de extração influenciou seu efeito ($\chi^2 = 7,13$; $p = 0,028$), pois o extrato de 30 minutos apresentou uma maior capacidade de erradicação quando comparado ao extrato de 60 minutos ($p = 0,003$).

Nos estudos de Nostro et al. (2007) observa-se resultados semelhantes em testes com

óleo essencial de orégano contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, resultando tanto na inibição como na erradicação do biofilme pré-formado. Para a erradicação foi preciso de uma quantidade maior do que para a inibição, evidenciando uma maior resistência dos biofilmes, corroborando com os resultados do presente estudo.

Os ensaios da hemólise apresentaram como melhores resultados os extratos etanólicos, pois a maioria resultou em não tóxico, e apenas um dos testes obteve resultado inconclusivo. O extrato hidroalcoólico também foi satisfatório, com apenas alguns tóxicos e os extratos aquosos tiveram um predomínio de resultados indicativos de toxicidade.

A nanoformulação não apresentou atividade inibitória com base nas condições avaliadas. Esse resultado pode estar relacionado à diluição dos componentes, visto que, a concentração do extrato livre apresentava concentração de 50 mg/ mL, e a nanoformulação apresentava 0,29 mg/mL, correspondendo aproximadamente uma concentração 172 vezes menor que a do extrato livre. Dessa forma, essa baixa atividade pode estar relacionada a baixa quantidade de extrato encapsulado indicando a necessidade de ajustes metodológicos no processo da nanoformulação, para que resulte em uma maior concentração e, portanto resultados satisfatórios.

5 Conclusão

É possível concluir que a *Aloysia gratissima* apresenta ação antimicrobiana contra cepas de *S. aureus*, isolados de mastite bovina. O fator solvente demonstrou que o etanol apresentou o melhor efeito antimicrobiano em relação aos demais solventes. O fator tempo de extração também foi um fator determinante, visto que, a exposição por 15 minutos proporcionou resultados mais satisfatórios comparado aos tempos de 30 e 60 minutos. Da mesma forma, concentração de folhas utilizadas para o preparo do extrato demonstrou que a proporção de 5 g% apresentou maior eficácia antimicrobiana. Na avaliação do biofilme, o extrato etanólico apresentou inibição, porém sem diferença significativa entre os tempos de extração. Já na erradicação do biofilme pré-formado, observou-se influência no tempo, com maior grau de erradicação no tempo de 30 minutos. Quanto à toxicidade, os extratos etanólicos apresentaram menor potencial hemolítico. Por fim, a nanoformulação não apresentou eficácia antimicrobiana na concentração em que foi desenvolvida, requerendo ajustes metodológicos em seu preparo. Em suma, é possível concluir que extratos de *Aloysia gratissima* apresentam resultados promissores como alternativa no combate à mastite bovina.

Referências Bibliográficas

- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals**. Norma aprovada 3ª ed. Wayne, PA, CLSI document M31-A3, 2008.
- FESSI, H., et. al. **Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement**. *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.
- GOUVEIA, G. V. et al. **Mastite bovina: revisão bibliográfica**. *PubVet*, Maringá, v. 16, n. 12, e1296, 2022.
- MELO, J. O. et al. **Antimicrobial activity of extracts and isolated compounds from *Aloysia gratissima***. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Campinas, v. 17, n. 4, p. 990-996, 2015.
- NOSTRO, A, et. al. **Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms**. *Journal of Medical Microbiology*, Reading, v. 56, n. 4, p. 519-523, 2007.
- NOTCOVICH, S. et al. **Biofilm-forming potential of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in New Zealand**. *Veterinary Sciences*, Basel, v. 5, n. 1, p. 8, 2018.
- SANTOS, F. M.; et. al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from the leaves and flowers of *Aloysia gratissima*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 15, n. 4, p. 583–588, 2013.
- SCATAMBURLO, M. H.; WERLE, C. H. **Mastite bovina: revisão bibliográfica**. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, São Paulo, v. 11, n. 10, p. 2669-2680, 2025.
- SOUZA, M. A. et al. **Biological properties of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. (Verbenaceae)**. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, London, v. 2022, Article ID 1119435, 2022.
- TOMANIĆ, D.; SAMARDŽIJA, M.; KOVAČEVIĆ, Z. **Alternatives to antimicrobial treatment in bovine mastitis therapy: a review**. *Antibiotics*, Basel, v. 12, n. 4, p. 683, 2023.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; mastite; *Aloysia gratissima*; antimicrobiano.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2025-0142

Financiamento

