

JOÃO PAULO NATALINO DE SÁ

**AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE NANOCARREADOR COM EUGENOL
EM ISOLADOS BACTERIANOS DE MASTITE BOVINA**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GÉRIAS – BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal
de Viçosa - Campus Viçosa

T

S111a Sá, João Paulo Natalino de, 1981-
2017 Avaliação antimicrobiana de nanocarreador com eugenol em
isolados bacterianos de mastite bovina / João Paulo Natalino de Sá. -
Viçosa, MG, 2017.
xii, 73f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Nélcio José de Andrade.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Mastite. 2. Bovino - Doenças. 3. Agentes anti-infecciosos. I.
Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de
Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos. II. Título.

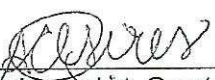
CDD 22 ed. 636.2089819

JOÃO PAULO NATALINO DE SÁ

**AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE NANOCARREADOR COM EUGENOL
EM ISOLADOS BACTERIANOS DE MASTITE BOVINA**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.

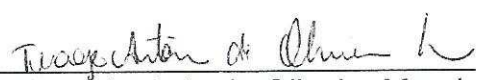
APROVADA: 02 de maio de 2017.



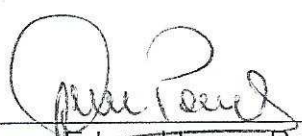
Ana Clarissa dos Santos Pires
(Coorientadora)



Patrícia Érica Fernandes



Tiago Antônio de Oliveira Mendes



Wilmer Edgard Luera Peña



Nélcio José de Andrade
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Após quatro anos de doutorado e mais nove anos de vida acadêmica como discente fecho mais um ciclo em minha vida! E no decorrer destes últimos anos, não poderia deixar de expressar o agradecimento às pessoas que direta ou indiretamente tornaram a realização e execução desta tese possível.

Minha gratidão a minha mãe, que no percorrer de minha graduação, não mediu esforços para manter-me em Viçosa.

Às minhas irmãs, Patrícia e Renata e aos meus sobrinhos amados: Bernardo e Pedro, mesmo distantes fisicamente se fizeram de alguma forma presentes.

À Universidade Federal de Viçosa, pelas oportunidades concedidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao professor e orientador Nélio Jose de Andrade, pelos anos de ensinamentos, apoio, confiança e disponibilidade. Dez anos de muito ensino-aprendizado!

À coorientadora professora Patrícia Campos Bernardes, pela oportunidade concedida de iniciar como estagiário no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHMA) durante seu experimento de mestrado, sempre disposta a sanar meus inúmeros questionamentos, tonando-se uma grande norteadora nesta caminhada. E principalmente pelas inúmeras sugestões durante a execução desta tese.

À coorientadora professora Ana Clarissa, pelo apoio, disponibilidade e norteamto durante toda a execução deste trabalho, sem suas inúmeras sugestões esta tese não teria a mesma significância.

À Dr^a Patrícia Fernandes, pelos inúmeros conselhos, paciência, aprendizado e companheirismo.

Ao professor Tiago Mendes e seu orientado de iniciação científica, Higor Sette, pelo auxílio na realização da análise de *docking* molecular.

Ao professor Wilmer Edgard por aceitar o convite em fazer parte da banca de defesa.

Ao Professor Leandro Licursi pela disponibilidade, boa vontade e sugestões durante a execução das análises de citometria de fluxo.

Ao doutorando Fernando Augusto (BIOAGRO), pela enorme boa vontade, paciência e colaboração durante o uso do leitor de elisa.

À estagiária Jucimara Rodrigues, pela boa vontade e auxílio durante a realização das análises *in vitro*.

Aos funcionários do Núcleo de Microscopia da UFV, e do Centro de microscopia da UFMG, em especial a Janine e Raquel pela competência, presteza e generosidade.

A todos do Laboratório de Embalagens, em especial à Miriane.

À Natalia Nunes pelo auxílio, paciência e boa vontade durante a execução e análise dos dados estatísticos.

Aos colegas e amigos do LHMA e do THERMA, principalmente pelo cafezinho que reanimava o corpo. E em especial, a Carine e Richard, pelo ensinamento em algumas ferramentas operacionais.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos.

À Jussara e ao Matheus pela amizade, companheirismo, parceria e cumplicidade.

A Maria Nena, minha terapeuta, por fazer “me enxergar” e me tornar uma pessoa melhor...

E todos os demais amigos e colegas que indiretamente fizeram parte deste trabalho, seja durante um boa noite de risadas ou com um ombro amigo fornecendo suporte e afago.

A vocês: gratidão!

BIOGRAFIA

JOÃO PAULO NATALINO DE SÁ, filho de João Natalino Neto e Yêda de Sá nasceu em Juiz de Fora, Minas Gerais.

Em março de 2007, iniciou o curso de bacharel em Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, graduou-se em julho de 2010.

No ano 2011, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de mestrado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, finalizando em 2013, ano que iniciou o doutorado no mesmo programa e instituição, defendendo a tese em maio de 2017.

Sumário

LISTA DE TABELA.....	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO.....	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo Geral	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1. Mastite bovina	3
3.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	4
3.1.2. <i>Escherichia coli</i>	6
3.2. Impactos relacionados à mastite bovina	7
3.3. Controle microbiano de mastite bovina	10
3.3.4. Eugenol.....	11
3.4 Nanocarreadores.....	13
3.5. Albumina do soro bovino (BSA)	15
3.6. Potencial zeta e tamanho.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Avaliação microbiológica.....	21
4.1.1. Suspensão de micro-organismos.....	21
4.1.2. Preparação do nanocarreador (BSA) com eugenol.....	21
4.1.3. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB).....	22
4.1.4. Determinação da viabilidade de células vegetativas de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> por citometria de fluxo após imersão em E e BSA-E.....	23
4.1.5. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV).....	24
4.1.6. Contagens de células aderidas após imersão em cupons de aço inoxidável e borracha em dispersões com E e BSA-E.....	25

4.2. Determinação do tamanho, potencial zeta (ζ) e estabilidade cinética do nanocarreador livre (BSA) e com eugenol (BSA-E).....	26
4.3. Predição do modo de ligação entre eugenol e BSA em diferentes valores de pH por docking molecular.....	27
5. DELINEAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
6.1. Avaliação microbiológica.....	29
6.1.1. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB).....	29
6.1.2. Avaliação da viabilidade de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> por citometria de fluxo após imersão em E e BSA-E em diferentes valores de pH.....	32
6.1.3. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV).....	39
6.1.4. Contagens de células aderidas após imersão de superfícies de aço inoxidável e borracha em dispersões com E e BSA-E.....	42
7.0 Caracterização e estabilidade físico-química do nanocarreador	46
7.1 Tamanho e Potencial Zeta (ζ)	46
7.2 Predição do modo de ligação entre eugenol e BSA em diferentes valores de pH por docking molecular	54
8. CONCLUSÃO.....	57
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Principais tipos e agentes causadores de mastite bovina 4

Tabela 2 - Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) de eugenol nanocarreado (BSA-E) e livre (E) sobre isolados bacterianos mastitícos..... 29

Tabela 5 – Media e desvio padrão do número de células bacteriana aderidas (log UFC·cm²) em aço inoxidável e borracha após 30 min de imersão em eugenol livre (E) e nanocarreado (BSA-E) em diferentes pH 44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do eugenol	12
Figura 2 - Estrutura da BSA com seus diferentes sítios. Em destaque as principais regiões de interações com moléculas hidrofóbicas (sitio I e II).	16
Figura 3 - Diferentes isômeros da conformação da BSA de acordo como o pH do meio.	17
Figura 7 - Porcentagem de células inviáveis após a imersão por 5 min de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> em eugenol livre (E) e nanocarreado (BSA-E) em diferentes valores de pH.	34
Figura 8 - Porcentagem de células inviáveis após a imersão por 15 min de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> sobre eugenol livre (E) e nanocarreado (BSA-E) em diferentes valores de pH.	36
Figura 9 - Porcentagem de células inviáveis após a imersão em de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> em solução tampão citrato com pH 3,5 (ST-3,5) por 18 h.	37
Figura 10 - Avaliação da porcentagem de células inviáveis de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> após imersão por 18 h. em eugenol livre (E) e nanocarreado (BSA-E) em diferentes valores de pH.	38
Figura 11 - Fotomicrografias de células de <i>Escherichia coli</i> após a exposição a diferentes tratamentos: A= controle; B= E- 3,5; C= E-5,0; D= E=7,0; E= BSA-E 3,5; F= BSA-E 5,0; G= BSA-E 7,0. Setas indicando prováveis deformações morfológicas.	40
Figura 12 - Avaliação morfológica de <i>Staphylococcus aureus</i> por MEV após o condicionamento em diferentes tratamentos: A= controle; B= E- 3,5; C= E-5,0; D= E=7,0; E= BSA-E 3,5; F= BSA-E 5,0; G= BSA-E 7,0. Setas indicando prováveis deformações morfológicas.	41
Figura 13 - Tamanho (nm) da BSA livre (BSA) e com eugenol na CMB (BSA-E) em função de diferentes valores de pH 3,5; 5,0 e 7,0 (Tempo 0).	47
Figura 14 - Potencial zeta (mV) da BSA livre (BSA) e com eugenol (BSA-E) em função de diferentes valores de pH 3,5, 5,0 e 7,0 (Tempo 0).	48

RESUMO

SÁ, João Paulo Natalino de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2017. **Avaliação antimicrobiana de nanocarreador com eugenol em isolados bacterianos de mastite bovina.** Orientador: Nélcio José de Andrade. Coorientadores: Ana Clarissa dos Santos Pires e Patrícia Campos Bernardes.

A mastite bovina ocasiona a inflamação da glândula mamária, podendo ser contagiosa ou ambiental. Antimicrobianos não convencionais, como o eugenol, pode ser uma alternativa para o controle desta enfermidade. Porém a elevada hidrofobicidade e volatilização do eugenol, dificultam sua utilização em sistemas aquosos. Visando minimizar estes aspectos negativos, foram obtidos nanocarreadores à base de Albumina Sérica Bovina (BSA) veiculando eugenol (E) em diferentes pH (3,5, 5,0 e 7,0) e avaliado sua ação antimicrobiana pela Concentração Mínima Inibitória (CMI), Concentração Mínima Bactericida (CMB), teste de difusão em ágar; viabilidade celular por citometria de fluxo (CMF), Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e teste de imersão para remoção de células aderidas em cupons. A caracterização físico-química dos nanocarreadores foi realizada por tamanho, potencial zeta, estabilidade cinética e *docking* molecular. As amostras BSA-E apresentaram pela técnica de microdiluição, CMB iguais para *S. aureus* e *E. coli*: de 0,27 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ para BSA-E em pH 3,5 e 0,55 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ em pH 5,0 e 7,0. Em contrapartida, as amostras com eugenol livre (E) apresentaram CMB com concentrações mais elevadas: 1,10 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ em pH 3,5 e 2,20 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ em pH 5,0 e 7,0. A partir da análise por CMF, foi verificado que as amostras com BSA-E independentemente do pH e da estrutura da parede celular, foram capazes de inativar mais de 99% das células de isolados bacterianos em menor tempo de imersão (5 min). Estes dados corroboram com as análises de MEV, que demonstraram acentuada modificação na estrutura da membrana celular após imersão com BSA-E por 30 min. A partir do teste de imersão por 30 min, de cupons de aço inoxidável e borracha utilizada em teteiras de ordenhadeiras mecânicas com células aderidas de *E. coli* e *S. aureus*, foi possível verificar que somente as formulações BSA-E, independentemente do pH, atenderam às recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) de até 50 UFC·cm⁻² de mesófilos aeróbios,

para a superfície de aço-inoxidável, embora constatado, uma redução de 99,99% de células aderidas na superfície da borracha. As amostras BSA e BSA-E, em pH 3,5, apresentaram diâmetro hidrodinâmico de $10,66 \pm 0,13$ nm e $11,03 \pm 0,015$ nm, respectivamente, superior ao pH 5,0 ($7,39 \pm 0,18$ nm e $7,95 \pm 0,014$ nm) e pH 7,0 ($8,12 \pm 0,29$ nm e $8,17 \pm 0,13$ nm). Em pH 3,5 o potencial zeta para BSA e BSA-E foram respectivamente de $+8,8 \pm 0,14$ mV e $+8,91 \pm 0,15$ mV. Para o pH 5,0 e 7,0 foram de $-3,95 \pm 0,09$ mV e $-4,12 \pm 0,12$ mV e $-12,57 \pm 0,18$ mV e $-12,39 \pm 0,13$ mV, para BSA e BSA-E, respectivamente. Os valores de diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e pH, mantiveram-se estáveis durante 15 dias. A técnica por *docking* molecular, foi capaz de prever que a ligação eugenol com a BSA foi termodinamicamente favorável, e que eugenol está localizado no interior de um bolsão formado pela interação entre os três domínios (I, II e III) da BSA, sendo este bolsão composto principalmente de aminoácidos hidrofóbicos e básicos, que favoreceram a interação do ligante com a proteína. Neste contexto o eugenol nanocarreado por BSA demonstra ser uma alternativa viável para o controle e ou prevenção da mastite bovina ocasionada por *E. coli* e ou *S. aureus*.

ABSTRACT

SÁ, João Paulo Natalino de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2017.
Antimicrobial evaluation of eugenol nanocarrier in bacterial isolates of bovine mastitis Advisor: Nélcio José de Andrade. Co-Advisors: Ana Clarissa dos Santos Pires and Patrícia Campos Bernardes.

Bovine mastitis causes inflammation of the mammary gland, and may be contagious or environmental. Unconventional antimicrobial agents, such as eugenol, may be an alternative for the control of this disease. However, the high hydrophobicity and volatilization of eugenol make it difficult to use in aqueous systems. In order to minimize these negative aspects, Bovine Sodium Albumin (BSA) nanocarriers were obtained by carrying eugenol (E) at different pH (3.5, 5.0 and 7.0) and evaluated its antimicrobial action by the Minimal Inhibitory Concentration), Minimum Bactericidal Concentration (CMB), agar diffusion test; Cell viability by flow cytometry (CMF), Scanning Electron Microscopy (SEM) and immersion test to remove adhered cells in coupons. The physico-chemical characterization of the nanocarreadores was performed by size, zeta potential, kinetic stability and molecular docking. The BSA-E samples showed the same microbial dilution for *S. aureus* and *E. coli*: $0.27 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ for BSA-E at pH 3.5 and $0.55 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ PH 5.0 and 7.0. In contrast, formulations with free eugenol (E) showed higher concentrations of CMB: $1.10 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ at pH 3.5 and $2.20 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ at pH 5.0 and 7.0. From the CMF analysis, it was verified that BSA-E samples, regardless of pH and cell wall structure, were able to inactivate more than 99% of the cells of bacterial isolates in a shorter immersion time (5 min). The results corroborate the SEM analyzes, which demonstrated a marked change in the cell membrane structure after immersion with BSA-E for 30 min. From the 30 min immersion test of stainless steel coupons and rubber used in mechanical milking teats with adhered *E. coli* and *S. aureus* cells, it was possible to verify that only the BSA-E formulations, regardless of pH, Met the recommendations of the World Health Organization (WHO) of up to $50 \text{ CFU} \cdot \text{cm}^{-2}$ of aerobic mesophiles, for the stainless-steel surface, although found, a 99.99% reduction of adhered cells on the rubber surface. The BSA and BSA-E samples, at pH 3.5, had a hydrodynamic diameter of $10.66 \pm 0.13 \text{ nm}$ and $11.03 \pm 0.015 \text{ nm}$, respectively, higher than pH 5.0

(7.39 ± 0.18 nm and 7.95 ± 0.014 nm) and pH 7.0 (8.12 ± 0.29 nm and 8.17 ± 0.13 nm). At pH 3.5 the zeta potential for BSA and BSA-E were respectively 8.8 ± 0.14 mV and $+ 8.91 \pm 0.15$ mV respectively. For pH 5.0 and 7.0 were -3.95 ± 0.09 mV and $- 4.12 \pm 0.12$ mV and -12.57 ± 0.18 mV and -12.39 ± 0.13 mV, for BSA and BSA-E, respectively. The values of hydrodynamic diameter, zeta potential and pH remained stable for 15 days. The molecular docking technique was able to predict that the eugenol binding with BSA was thermodynamically favorable, and that eugenol is located inside a pocket formed by the interaction between the three BSA domains (I, II and III), this being A pocket composed mainly of hydrophobic and basic amino acids that favored the interaction of the ligand with the protein. In this context, BSA nanoparticle-encapsulated eugenol is a viable alternative for the control and / or prevention of bovine mastitis caused by *E. coli* and / or *S. aureus*.

1. INTRODUÇÃO

Entre os diversos desafios na cadeia produtiva de leite e derivados, destaca-se a mastite bovina, uma enfermidade multifatorial de extensão mundial. A mastite afeta a sanidade do animal, levando a diversos prejuízos econômicos decorrentes da diminuição da secreção láctea, ou da perda total desta capacidade, além de representar um importante problema de saúde pública, tais como infecção ou intoxicação alimentar.

Esta enfermidade levanta desafios consideráveis, sobretudo pela crescente demanda de informações em relação ao uso e possíveis correlações negativas de antimicrobianos sintéticos para inativar ou inibir a multiplicação de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes associados à mastite bovina.

A nanotecnologia, por meio do nanoencapsulamento de diferentes agentes terapêuticos, demonstra ser uma alternativa promissora para melhorar a efetividade de diferentes princípios ativos, como por exemplo, o desenvolvimento de nanocarreadores veiculando compostos naturais com ação antimicrobiana, visando melhorar a eficácia destas substâncias, dentre elas, os óleos essenciais.

Os óleos essenciais são líquidos voláteis, sintetizados principalmente a partir do metabolismo secundário de plantas aromáticas, sendo amplamente utilizados em alimentos, como agentes aromatizantes, perfumes e fármacos. Dentre os diferentes componentes presentes nos óleos essenciais, destaca-se o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), que apresenta ação anti-inflamatória, anestésica, antimicrobiana, antioxidante, dentre outros.

Entretanto, o eugenol apresenta elevada volatilidade, susceptibilidade à degradação oxidativa, e baixa solubilidade em água, que dificultam a sua utilização.

Neste contexto, o desenvolvimento de um nanocarreador a partir da BSA veiculando o eugenol, pode ser uma alternativa promissora, possibilitando uma melhor dispersão do eugenol em meio aquoso, além de possibilitar melhorias em relação à sua estabilidade físico-química, auxiliando na prevenção e controle de *E. coli* e *S. aureus* relacionados à mastite bovina.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Obter e avaliar a ação antimicrobiana sobre isolados bacterianos de mastite bovina de um nanocarreador à base de albumina do soro bovino (BSA) com eugenol e determinar sua caracterização físico-química.

2.2. Objetivos específicos

- I. Obter um nanocarreador de eugenol à base de BSA em diferentes valores de pH (3,5, 5,0 e 7,0) em meio aquoso;
- II. Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB), do eugenol livre (E) e nanocarreado (BSA-E), em diferentes valores de pH sobre isolados de mastite: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922);
- III. Determinar por citometria de fluxo a viabilidade celular de *S. aureus* e *E. coli*, tratados com E e BSA-E em diferentes pH;
- IV. Verificar a morfologia celular dos isolados de mastite após o tratamento com o E e BSA-E em diferentes condições por Microscopia eletrônica de Varredura (MEV);
- V. Quantificar a adesão de *S. aureus* e *E. coli* em superfícies de aço inoxidável e borracha de teteira utilizada em ordenhadeira mecânica, após a imersão em eugenol livre e nanocarreado;
- VI. Caracterizar e analisar a estabilidade cinética do nanocarreador na presença e ausência de eugenol por diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e pH;
- VII. Realizar a predição da ligação entre o eugenol com a BSA por modelagem molecular (*docking*) em diferentes valores de pH (3,5, 5,0 e 7,0).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Mastite bovina

A mastite bovina (mastro = mama; ite = inflamação) é considerada como a principal doença que afeta o gado leiteiro em todo mundo, sendo definida como uma inflamação da glândula mamária, ocasionada por agentes multifatoriais. Apesar de intensa investigação e a implementação de estratégias visando seu controle ao longo de décadas, a mastite bovina continua afetando o gado leiteiro mundialmente (SHAHEEN; TANTARY; NABI, 2016; VIGUIER et al., 2009).

A mastite bovina pode ser classificada, quanto à forma de apresentação, em clínica ou subclínica. A forma clínica é diagnosticada por sinais evidentes de inflamação, como edema, aumento de temperatura corporal, endurecimento e dor na glândula mamária, e/ou aparecimento de grumos, pus ou qualquer alteração das características macroscópicas do leite. Na forma subclínica não ocorrem mudanças visíveis no aspecto do leite ou do úbere, mas uma infecção assintomática, caracterizada principalmente por mudanças na composição do leite. A ausência de sintomas da mastite subclínica relaciona-se diretamente com a alta prevalência dessa doença nos rebanhos leiteiros (BRADLEY, 2002; SILVA, 2016; WHELEHAN et al., 2011).

A mastite bovina, pode ser de natureza infecciosa (provocada por micro-organismos) ou não infecciosa (provocada por agentes físicos, produtos químicos, dentre outros). As mastites de natureza infecciosa são as mais problemáticas para a produtividade do rebanho, principalmente em razão de serem transmissíveis (NICKERSON; OLIVER, 2014; OLIVEIRA, et al., 2011).

Um grupo diversificado de micro-organismo (Tabela 1) tem sido reportado à mastite bovina, que incluem bactérias, leveduras e fungos filamentosos. A incidência de infecções virais e micoplasmas relacionados à mastite, também são relatados pela literatura, porém com menores prevalências (CAPURRO et al., 2010; KEEFE, 2012; PYORALA, 2009).

Tabela 1- Principais tipos e agentes causadores de mastite bovina

MASTITE BOVINA	
Mastite contagiosa	Mastite ambiental
<i>S. aureus</i> (40 -70%)	<i>E. coli</i> (40%)
<i>S. agalactiae</i> (8 -10%)	<i>Klebsiella spp</i>
<i>Mycoplasma spp</i> (5 -12%)	<i>Arcanobacter spp</i>
<i>C. bovis</i> (1- 1,7%)	
<i>S. dysgalactiae</i> (1,6%)	
<i>S. uberis</i> (1,4%)	

(Fonte : SHAHEEN; TANTARY; NABI, 2016; adaptado).

Os agentes contagiosos vivem e se multiplicam sobre ou no interior da glândula mamária e sua transmissão ocorre de animal para animal ou de teto para teto, principalmente, durante a ordenha. Os agentes ambientais vivem no meio onde os animais são criados e a infecção das glândulas é favorecida no período entre as ordenhas. A mastite por agentes ambientais instala-se quando a imunidade do hospedeiro está comprometida ou quando as condições higiênicas sanitárias não são adequadas (KULKARNI; KALIWAL, 2013; OLIVER et al., 2004).

3.1.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus é considerado como o agente contagioso mais prevalente em mastite bovina. É uma bactéria de difícil tratamento devido à elevada resistência aos antibióticos. Em levantamentos epidemiológicos nacionais e internacionais, essa bactéria está presente em cerca de 50% das infecções da glândula mamária em bovinos leiteiros (BRADLEY, 2001; KULKARNI; KALIWAL, 2013).

S. aureus está presente em diferentes tipos de vetores, tais como a pele dos animais, tetos, amígdalas, cama do gado e mãos do ordenhador, que favorecem sua disseminação e elevada contaminação (BARKEMA; SCHUKKEN; ZADOKS, 2006; GAO et al., 2012).

A infecção da mastite estafilocócica ocorre principalmente via teto. *S. aureus* coloniza a extremidade do teto, principalmente nos casos em que há

lesão prévia, invade a cisterna e se estabelece no tecido secretório. Possivelmente, este micro-organismo utiliza proteínas expostas através de microlesões, ou presentes em coágulos de sangue, como substrato para adesão na colonização e no desenvolvimento das infecções (CHAGAS et al., 2012; ZADOKS et al., 2004).

A prevalência de cura de mastites resultantes da infecção por *S. aureus* é considerada geralmente muito baixa, principalmente pela inadequada penetração dos antibióticos no local de infecção e pelo aparecimento de resistência desta bactéria, propiciado entre outros fatores, pela formação de beta-lactamases, enzima que confere resistência do agente aos antibióticos beta-lactâmicos, os mais utilizados para o tratamento de infecção de mastite bovina por *S. aureus*. Entre os beta-lactâmicos, destacam-se as penicilinas, penetamato, ampicilina e amoxiciclina (AIRES, 2010; RADOSTITS et al., 2007).

Bardiau et al. (2013) estudaram a possível correlação da presença de cápsula, de genes indutores à formação de biofilme e a sobrevivência intracelular sobre os isolados de *S. aureus* provenientes de vacas mastíticas e concluíram existir uma correlação entre essas três características responsáveis pelas baixas taxas de curas relacionadas a infecção ocasionadas por este patógeno.

Além destes fatores supracitados, bactérias do gênero *Staphylococcus* possuem genes associados ao processo de adesão e formação de biofilmes, e de genes que codificam a produção de toxinas termoressistentes, que são proteínas alvo em vários estudos visando o desenvolvimento de vacinas (BOERHOUT et al., 2016; CAMUSSONE et al., 2014; PETON et al., 2014).

A disseminação desta bactéria ocorre principalmente durante a ordenha, sendo seu controle e prevenção realizado por meio de ferramentas que possam minimizar a sua propagação para os quartos não infectados, o que é obtido pela adoção de higiene adequada na ordenha, terapia de vaca seca e descarte de animais cronicamente infectadas que não respondem ao tratamento. Durante o processo de ordenha é importante além de rigorosa higiene do teto, a utilização de pré e pós dipping com soluções anti-sépticas, utilizadas de acordo com as recomendações do fabricante (KEEFE, 2012; ROYSTER; WAGNER, 2015; ZAFALON et al., 2007).

3.1.2. *Escherichia coli*

E. coli é considerado um dos principais agentes de mastite bovina ambiental em todo o mundo. A mastite causada por *E. coli* geralmente apresentam manifestações clínicas hiperaguda ou agudas, nas primeiras semanas de lactação, com morte ocasional do animal. Tem se observado de maneira preocupante, casos de mastite subclínica por *E. coli* em rebanhos com bom controle de mastite contagiosa, resultando em infecções persistentes na glândula mamária, tanto na lactação quanto no período seco (BLUM; LEITNER, 2013; GOMES et al., 2016; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; KEMPF; LOUX, 2015).

Fatores de virulência são necessários para colonizar e infectar o hospedeiro e para driblar os mecanismos de defesa do mesmo. Os principais fatores de virulência para *E. coli* incluem toxinas, adesinas, proteínas secretadas em células hospedeiras, cápsulas de polissacarídeos e antígeno O (LEHTOLAINEN, 2004; MAIA, 2011).

Fernandes et al. (2011) evidenciaram que a patogenicidade de isolados de *E. coli* em vacas com mastite, não é mediada por um fator de virulência único e específico, classificando esta bactéria como "patógeno oportunista" com diferentes fatores de virulência. Eles relataram diferentes combinações de fatores de virulência nos isolados de *E. coli*, sendo o gene *fimH*, responsável pela expressão das fímbrias tipo 1, que desempenha importante papel no processo de adesão e formação de biofilme, observado em todos os isolados testados (FERNANDES et al., 2011).

Dentre os diferentes fatores de virulência destaca-se o fator necrosante citotóxico (CNF), que no homem está relacionado a distúrbios entéricos, infecções do trato urinário e septicemias. O CNF em animais também está associado às infecções intestinais, principalmente em casos de *E. coli* produtoras de alfa-hemolisinas (LEHTOLAINEN, 2004; MAIA, 2011).

No Brasil, Ribeiro et al. (2002) descreveram linhagem de *E. coli* produtora de fator CNF, alfa-hemolisina e sideróforo em vaca com mastite clínica hiperaguda. De maneira similar, detectou-se a produção de CNF e alfa-hemolisina em um animal com mastite clínica, indicando que, provavelmente, as estirpes produtoras de CNF, hemolisinas e/ou sideróforos, teriam mecanismos

adicionais de virulência e estariam associadas, predominantemente, a casos clínicos de infecção na glândula mamária em bovino (RIBEIRO et al., 2002).

A abordagem inicial ao tratamento desta infecção por *E. coli*, consiste em controlar os sinais inerentes à infecção, com fluidoterapia intensa, ordenha dos quartos afetados com maior frequência, e a utilização de antimicrobianos deve servir apenas de suporte para assegurar a eliminação da infecção, e evitar a ocorrência de casos crônicos e de situações de septicemia (AIRES, 2010; ERSKINE et al., 1993).

Como medida adicional de controle, pode-se relacionar o adequado fornecimento de minerais visando o aumento da capacidade imune da vaca (vitaminas A e E, cobre, selênio e zinco) e o uso de programas de vacinação. O uso da vacina J5 (com a cepa mutante de *E. coli* O111:B4) tem mostrado ser eficaz na redução da severidade de sintomas clínicos da mastite por *E. coli* e coliformes em geral, sendo economicamente viável quando a incidência destes casos de mastite é superior a 1%. Contudo, a vacina não previne casos de mastite e nem substitui as medidas de controle apontadas (HOGAN; SMITH, 2003; MAIA, 2011).

3.2. Impactos relacionados à mastite bovina

Dentre as principais consequências da mastite bovina, destacam-se: os prejuízos financeiros ao produtor e ao setor industrial de lácteos, e à saúde dos consumidores.

Para o produtor, os fatores que compõem os custos da mastite bovina para a propriedade leiteira, as perdas de leite, sejam elas ocasionadas ou pela redução da produção pela vaca afetada ou pelo descarte do leite contaminado com resíduos de antimicrobianos, representam a maior fonte de custos da doença. O descarte de animais também se apresenta como um importante fator de custo que, diante de um baixo preço de leite somado a um alto preço de compra de animais de reposição, pode superar os custos gerados pelas perdas de leite. Medicamentos, serviços veterinários e trabalho extra também estão entre importantes fatores que compõem as consequências econômicas da mastite bovina (DEMEU et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2011).

A alteração da qualidade do leite ocasionada pela mastite bovina está relacionada principalmente pelas alterações em três principais componentes do leite: gordura, proteína e lactose.

Em relação as proteínas, observa-se uma redução naquelas sintetizadas na glândula mamária (α e β caseína, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina) e aumento das proteínas de origem sanguínea (albumina sérica e imunoglobulinas), em virtude do aumento de permeabilidade vascular secundário ao processo inflamatório. Porém este aumento na concentração total de proteína não deve ser considerado favorável à qualidade do leite, pois em situações de mastite, normalmente, este aumento está relacionado a elevação do percentual de imunoglobulinas visando combater a infecção (GARGOURI; HAMED; ELFEKI, 2013; MACHADO, et al., 2000; ROMA et al., 2009).

De forma geral, observa-se uma correlação entre o aumento na CCS e uma tendência na diminuição na concentração de gordura presente no leite com mastite, mas nos casos em que a produção de leite pelo animal diminui de forma muito acentuada, a concentração de gordura tende a aumentar em animais com CCS elevadas devido ao efeito de concentração. Os tipos de ácidos graxos presentes no leite tendem a alterar, uma vez que a atividade das lipases no leite com mastite pode ser favorecida, implicando no aumento da concentração de ácidos graxos livres e de ácidos graxos insaturados de cadeia curta e na diminuição da concentração dos ácidos graxos de cadeia longa, favorecendo a diminuição da qualidade nutricional e sensorial do leite (AIRES, 2010).

A lactose é o componente do leite com maior redução, sendo que a redução deste carboidrato no leite, ocorre devido à sua menor síntese, ocasionada pela destruição do tecido secretor. A perda de lactose da glândula mamária para a corrente sanguínea é decorrente do aumento da permeabilidade da membrana que separa o leite do sangue e à utilização da lactose pelos patógenos intramamários (BRASIL, 2016; MACHADO et al., 2000; SHUSTER et al., 1991).

A redução no teor de lactose, caseína, gordura, cálcio e fósforo e o aumento nas imunoglobulinas, cloretos e lipases, sendo a última responsável pela rancificação do leite, favorecem a produtos de menor qualidade físico-química, tornando-os sensorialmente inaceitáveis. Com estas alterações, o leite

pode tornar-se impróprio para o consumo e menos atrativo para a produção de derivados (CASSOL, 2010; FERREIRA, et al., 2015).

Além desses inconvenientes, a mastite representa risco potencial à saúde do consumidor. A possibilidade de desencadear fenômenos alérgicos em indivíduos sensíveis e a possibilidade de seleção de bactérias resistentes no trato digestório decorrentes do uso de antibióticos são outros riscos, aos quais os consumidores são expostos ao consumirem leite oriundo de animais acometidos por essa enfermidade.

A literatura reporta casos de infecções hospitalares causadas por *S. aureus* multirresistente à metilina (MRSA), produtores de enterotoxina, que foram identificados no leite bovino, sendo um possível risco a saúde do consumidor, não apenas pela possibilidade de intoxicação, mais também, pela possível geração de resistência microbiana (MOON et al., 2016; SHAHEEN; TANTARY; NABI, 2016).

O risco para a saúde humana causado por *Mycobacterium bovis*, agente causal da mastite tuberculosa, é motivo de grande preocupação, particularmente nos países em desenvolvimento como o Brasil, inclusive, infere-se que a infecção por este patógeno veiculado pelo leite *in natura* seja a principal causa de doença tuberculosa não pulmonar em seres humanos (GRANGE; GRANGE, 2001; SHAHEEN; TANTARY; NABI, 2016).

Mesmo que a mastite bovina seja uma doença de difícil erradicação na pecuária leiteira, cuidados relacionados ao manejo durante a ordenha devem ser tomados da melhor forma possível, a fim de evitar a disseminação de agentes infecciosos que desencadeiam reações inflamatórias, ou ainda os efeitos tóxicos oriundos das alterações causadas pelo uso de antibióticos no controle da infecção, pois estes constituem um risco à saúde dos consumidores, além de inúmeras consequências econômicas para o produtor e para a indústria de leite e derivados.

3.3. Controle microbiano de mastite bovina

Embora mais de 137 espécies, subespécies e sorotipos de micro-organismos já tenham sido isolados de infecções da glândula mamária bovina, a maioria das infecções é causada por bactérias. Dentre as bactérias, um número limitado dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* e do grupo dos coliformes causa a maior parte das infecções (BRADLEY, 2002; CAPURRO et al., 2010; ERSKINE, et al., 1993).

Ainda que o controle desta enfermidade seja fundamentado na adoção de medidas higiênico-sanitárias, a antibioticoterapia pode exercer um importante papel especialmente se considerada a possibilidade da redução das infecções intramamárias e, a consequente eliminação das prováveis fontes de infecção (ERSKINE et al., 1993; BARKEMA et al., 2009).

A forma subclínica de infecção, apesar de menos evidente para o produtor do que a manifestação clínica, é a que mais afeta o rendimento econômico na produção de leite. O impacto das mastites subclínicas deriva da diminuição do nível de produção e qualidade do leite, particularmente por aumento do número de células somáticas, constituindo igualmente a razão mais frequente para a administração de antibióticos em bovinos leiteiros (HILLERTON; BERRY, 2005).

Dentre os diferentes antibióticos sintéticos visando o controle e minimização da mastite bovina, destacam-se: penicilina, estreptomicina, ampicilina e tetraciclina, cefalosporinas, gentamicina, novobiocina, cloranfenicol, nitrofurantoína, polimixina B e as associações de sulfametoxazol e trimetoprim e de neomicina, bacitracina e tetraciclina (BARKEMA; SCHUKKEN; ZADOKS, 2006; ERSKINE et al., 1993; KEEFE, 2012).

Os tratamentos mais comuns são baseados na infusão intramamária de agentes antimicrobianos, mas as taxas de cura com estas drogas não são sempre efetivas, verificando-se grandes variações na eficiência do tratamento para os diferentes agentes causadores de mastite. Além disso, a utilização de antibióticos sintéticos pode favorecer à seleção de bactérias resistentes e à presença de resíduos no leite (GAO et al., 2012; ZAFALON et al., 2007).

Dessa forma, o uso de compostos derivados de plantas, como os óleos essenciais, configura-se como uma alternativa para o controle da mastite bovina, em substituição aos antibióticos convencionais.

A *International Standard Organization* (ISO) define os óleos essenciais (OE's), como produtos obtidos de partes de plantas através de destilação. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências (ISO/TC 54).

Normalmente, esta mistura complexa encontrada nos OE's são comumente utilizados em alimentos, tais como ervas e especiarias, sendo os derivados terpênicos, como os mono e sesquiterpenos e os fenilpropanóides um dos componentes principais dos OE's (CALO et al., 2015; CHEN, et al., 2017).

A classe de fenilpropenos constituem uma subfamília entre os vários grupos de compostos orgânicos chamados fenilpropanóides, os quais são sintetizados a partir da fenilalanina nas plantas. A atividade antimicrobiana dos fenilpropenos depende do número e tipo de substituintes no anel aromático, da estirpe microbiana e dos parâmetros utilizados em testes experimentais, tais como: o meio de crescimento, temperatura, dentre outros. Entre os fenilpropenos os mais pesquisados são o eugenol, isoeugenol, vanilina, safrol e o cinamaldeído (BARCELOUX, 2008; SAJJAD, et al., 2012).

3.3.4. Eugenol

Os óleos essenciais de plantas aromáticas, geralmente ervas ou especiarias, são um grupo de agentes antimicrobianos que ocorrem naturalmente, em grande parte, como síntese do metabolismo secundário. Tradicionalmente utilizados como agentes aromatizantes, estão se tornando objetos de pesquisas, devido aos seus efeitos antifúngicos, antibacterianos e propriedades antioxidantes (BURT, 2004; CALO et al., 2015; FALEIRO M.L., 2011).

Dentre os diferentes compostos presentes nos óleos essenciais destaca-se o eugenol (Figura 1), que apresenta uma estrutura molecular composta por $C_{10}H_{12}O_2$, sendo denominado pela *International Union of Pure and Applied Chemistry*, (IUPAC) por 4-Alil-2-metoxifenol.

O eugenol apresenta massa molar de $164,2 \text{ g.mol}^{-1}$, com o pK_a de 10,19 a 25°C , sendo extraído principalmente do óleo de cravo, óleo de cânfora, óleo

de folha de canela e óleo de noz-moscada. Em temperatura ambiente, é um líquido viscoso amarelo, hidrofóbico e com um odor pronunciado de cravo. Sendo amplamente utilizado na odontologia, anestésicos, analgésicos, como agentes anti-inflamatórios e antibacterianos (KONG et al., 2014; CHAIEB et al., 2007)

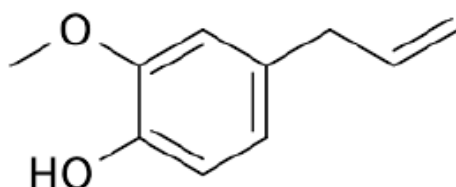


Figura 1 - Estrutura química do eugenol

Tanto a Organização para Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) têm permitido uma dose diária aceitável de eugenol de 2,5 mg/kg de peso corporal para os seres humanos. Além disso, o *Food and Drug Administration* (FDA) reportou o eugenol como substância segura e considerada não carcinogênica e não mutagênica (KONG et al., 2014).

Diferentes atividades biológicas de eugenol são reportadas pela literatura, incluindo atividades antifúngica (AHMAD et al., 2010), antibacteriana (DEVI et al., 2010), antiparasitária (UEDA-NAKAMURA et al. 2011) analgésicas (GUENETTE et al. 2006), anticarcinogênica (MANIKANDAN et al., 2010); antioxidante (RADHA et al., 2013), ação contra fitopatógenos (VENTUROSIO et al., 2011), e atividade antiviral (TRAGOOLPUA; JATISATIENR, 2007).

O amplo espectro de ação do eugenol a diferentes micro-organismos encontra-se bem definido pela literatura, mas o mecanismo de ação antimicrobiana do eugenol ainda não está exatamente definido, diferentes estudos têm sido conduzidos com objetivo de esclarecê-lo.

Em relação à atividade antibacteriana, estudos conduzidos por Gill et al. (2006) relataram que o eugenol é capaz de inibir a atividade de ATP_{ases} ligadas à membrana de *E. coli* e *Listeria monocytogenes*, as quais estão envolvidas na geração de ATP e na regulação do pH celular.

Foi observado ainda que, apesar da inibição de ATP_{ases} causar redução na taxa de multiplicação destes micro-organismos em concentrações subletais de

eugenol, prejudicando a sobrevivência das células, o mecanismo principal de ação do eugenol foi considerado pela ruptura da membrana citoplasmática (GILL; HOLLEY, 2006).

Essa ruptura foi confirmada também por outros pesquisadores como o principal mecanismo de ação antibacteriana do eugenol contra *L. monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris*, *E. coli* (OYEDEMI et al., 2009) e *Salmonella Typhi* (DEVI et al., 2010).

Apesar de inúmeras evidências dos possíveis mecanismos de ação antimicrobiana de eugenol, mais estudos são necessários para validá-los.

Apesar dos benefícios da utilização de eugenol no controle de micro-organismo patogênicos e ou deterioradores, sua elevada hidrofobicidade e volatilização, torna-se um entrave para a sua utilização em sistemas aquosos. Neste contexto, nanocarreadores visando a veiculação desta substância e de outros óleos essenciais vêm sendo desenvolvidos visando minimizar estes desafios.

Nas últimas décadas, nanocarreadores com agentes fenólicos, como o eugenol, tornaram-se uma técnica de crescente interesse, possibilitando inúmeros benefícios que podem contribuir, dentre outros fatores, à proteção da degradação química (oxidação), melhor dispersão em sistemas aquosos, possível redução nas propriedades sensoriais (odor e sabor) e maior estabilidade físico-química (DONSÌ et al., 2014; WEISS et al., 2009).

3.4 Nanocarreadores

A nanociência e a nanotecnologia são áreas do conhecimento e inovação que vêm despertando interesse cada vez maior da comunidade científica. Pode ser conceituada como um conjunto de técnicas utilizadas para manipulação de átomos e moléculas para a criação de novos materiais em escala nanométrica (10^{-9} m) (BRASIL, 2011).

O grande interesse no estudo destes materiais se deve ao fato de apresentarem propriedades físico-químicas distintas do material base já conhecido, o que permite inúmeras novas possibilidades de aplicações. Dentre

estes, incluem-se, os nanocarreadores para o uso terapêutico, adjuvante terapêutico, diagnóstico ou em produtos para a saúde (FALLEIROS et al., 2011).

Entende-se por nanocarreador a nanoestrutura associada ou envolta a uma substância ativa, que seja capaz de transportá-la e direcioná-la para um alvo específico de determinado sistema no qual deve interagir (CERIZE, 2012; VILLANOVA et al., 2010).

Estima-se que cerca de 40% das moléculas descobertas farmacologicamente ativas são rejeitadas em sistemas aquosos, principalmente, por apresentarem reduzida solubilidade e disponibilidade. Para contornar tais problemas, carreadores micrométricos e nanométricos, capazes de modularem a liberação com alto grau de reprodutibilidade, surgiram como alternativas eficazes (VILLANOVA et al., 2010; WEISS, et al., 2009).

Existem diferentes tipos de carreadores nanoestruturados, como, as nanopartículas lipídicas (BEY-OULD SI SAID et al., 2016), nanopartículas poliméricas (OZTURK et al., 2010; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; YEGIN et al., 2015), os lipossomas (CHORILLI et al., 2004; BRANDELLI, 2012; LASIC et al., 1991), nanoemulsão (ANTON et al., 2007; BOVI, 2015); dentre outros, sendo pesquisados como nanocarreadores de diferentes princípios ativos para diferentes finalidades e aplicações.

Além dos nanocarreadores supracitados, outras nanoestruturas vêm sendo pesquisadas na área de alimentos com diferentes finalidades, como por exemplo, nanocarreadores de origem natural, como as obtidas por algumas proteínas do leite, tais como caseína, β -caseína e Albumina Sérica Bovina (BSA) (BANI-YASEEN, 2011; NAFISI; SADEGHI; PANAHYAB, 2017; ROY et al., 2010; NAIK; CHIMATADAR; NANDIBEWOOR, 2009).

A albumina tem sido uma das primeiras moléculas de escolha em sistemas carreadores de diferentes drogas e foi uma das primeiras nanopartículas aprovadas pela agência de Administração de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos (USFDA)(ZHAO et al., 2010).

Ao longo das últimas décadas, a albumina tem emergido como um veículo nanoestruturado versátil, demonstrando não apresentar efeito imunogênico, atóxico, além de ser, biodegradável e metabolizável *in vivo* (ELSADEK; KRATZ, 2012; KRATZ, 2008).

Neste contexto, os nanocarreadores vêm sendo considerados uma boa estratégia para veicular diferentes princípios ativos, como por exemplo, antimicrobianos não sintéticos, visando sua liberação controlada, melhorando a estabilidade do princípio ativo e o direcionamento de substâncias ativas em sítios específicos.

3.5. Albumina do soro bovino (BSA)

A albumina do soro bovino (BSA) desempenha importante função carregadora de compostos hidrofóbicos, os quais são insolúveis no plasma sanguíneo, além de atuar na eliminação de radicais livres de oxigênio e desativação de vários metabólitos lipofílicos tóxicos, como bilirrubina, apresentando afinidade por pequenos compostos aromáticos (HE, CARTER, 1992; INDYK, et al., 2015). Dentre os diferentes compostos aromáticos de pequena massa molar, que pode ser carregada pela BSA, tem-se o eugenol.

A BSA é uma proteína globular, com massa molar de 66,4 kDa, sendo constituída por uma sequência conhecida de 583 resíduos de aminoácidos, incluindo 17 ligações dissulfetos intramoleculares e um grupo tiol livre. O ponto isoelétrico da BSA é em pH de aproximadamente 4,6; sendo carregada negativamente em pH 7,0 e carga positiva no pH 3,0 (INDYK, et al., 2015; HE, CARTER, 1992).

A BSA é constituída principalmente por estruturas do tipo α -hélice, sendo formada pela presença de três domínios homólogos independentes (I, II, III). Cada um deste domínio compreende dois subdomínios A e B (IIA, IIIA e IB), denominados como “sítios” I, II e III, respectivamente (Figura 2) (JATTINAGOUDAR et al., 2016; HE; CARTER, 1992).

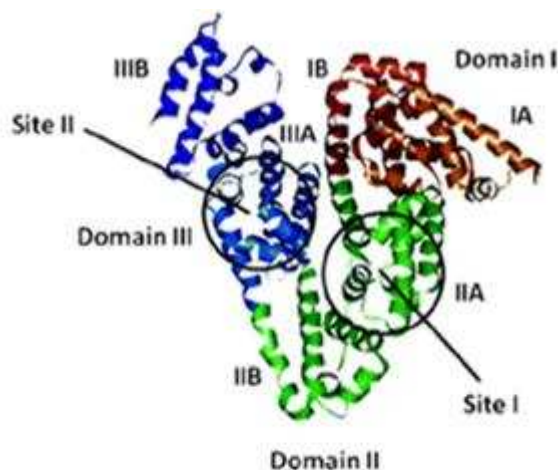


Figura 2 - Estrutura da BSA com seus diferentes sítios. Em destaque as principais regiões de interações com moléculas hidrofóbicas (sítio I e II).

A interação oferecida pelo sítio I ocorre principalmente por meio de interações hidrofóbicas, enquanto no sítio II envolve uma combinação de interações hidrofóbicas, ligação de hidrogênio e interações eletrostáticas. Desta forma, os locais de interação de albumina com moléculas exógenas ou endógenas de caráter hidrofóbico, como o eugenol, podem ser favorecidos, principalmente, pela presença dos subdomínios II e IIIA, conhecidos como sítios I e II, respectivamente (BANIPAL, et al., 2017; TAYEH et al., 2009).

Estes principais locais de interação na estrutura da BSA, os subdomínios IIA e IIIA, diferem em tamanho, flexibilidade, e afinidade de interação. O subdomínio IIA é maior e mais flexível quando comparado ao subdomínio IIIA. Além dessas duas regiões de ligação, a BSA apresenta o subdomínio IB, um microambiente localizado na interface mais externa da proteína. Quanto a presença de fluoróforo, a BSA apresenta dois fragmentos de triptofano denominados Trp-134 e Trp-212, localizados nos subdomínios IB e IIA, respectivamente (MOREIRA et al., 2014; CARTER, HO, 1994).

A estrutura nativa da BSA em determinado meio pode apresentar mudança na conformação mediante diferentes fatores, tais como, concentração da proteína, força iônica do meio, temperatura, pH, dentre outros, podendo favorecer em mudanças na conformação da proteína.

Dentre estes fatores, o pH pode promover mudanças na densidade de cargas da BSA devido a protonação/desprotonação de grupos ionizáveis. Estas

mudanças podem influenciar tanto as interações entre os segmentos da cadeia polipeptídica da BSA quanto as interações que esta proteína realiza com outras moléculas, como por exemplo, moléculas de eugenol que estão sendo carregados pela BSA (KUN et al., 2009; SILVA, 2015).

A estrutura tridimensional da albumina apresenta mudanças em sua conformação principalmente quando não se encontra em condições fisiológicas (pH 7,0), originado diferentes isômeros de sua estrutura nativa (N) de acordo com o pH do meio.

Em valores de pH entre 4,5 e 7,0 a sua conformação "N" (normal/nativa) é predominante. No intervalo de pH de 4,5 a 4,0, a BSA encontra-se sob a forma de transição, N-F, sendo que a forma F (flexível) é mais favorável quando ocorre uma redução abrupta do pH para valores menores que 4,0. A transição da forma F na conformação da BSA para a E (expandida) favorece ao desnovelamento das α -hélices no domínio I, e a maior flexibilização (desdobramento) do domínio III (transição da forma N para F), principalmente em valores próximos ao pH 4,8 (Figura 3) (NUNES, 2016; FERREIRA, 2009; MICHNIK, et al., 2005).

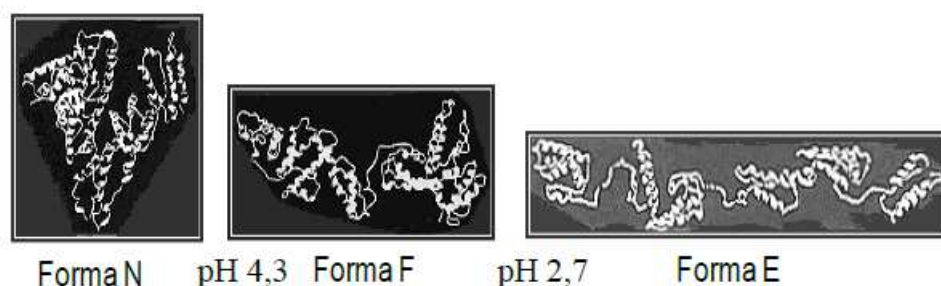


Figura 3 - Diferentes isômeros da conformação da BSA de acordo como o pH do meio.

Em pH menor que 3,5, observa-se a predominância da forma expandida da proteína (E). A transição da conformação N-F favorece à diminuição no conteúdo da estrutura ordenada (secundária), sendo que a BSA na forma de N é mais compacta em relação as demais formas, que tendem a ser mais expandidas (FERREIRA, 2009; MICHNIK, et al., 2005; NUNES, 2016).

Uma vez que a carga líquida da BSA pode ser alterada e até mesmo controlada pelo pH do meio, estudos da interação que envolve a BSA em

diferentes valores de pH, com moléculas que apresentam funcionalidade, como o eugenol, possuem grande significância para a área de alimentos, pois permitem avaliar, a partir de parâmetros físico-químico (diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta) e microbiológicos (CMI, CMB, teste de difusão em ágar, dentre outros).

O valor de pH no qual a BSA como carreadora de eugenol, poderá ter maior estabilidade cinética e funcionalidade, bem como as possíveis finalidades deste nanossistema em diferentes segmentos da área alimentícia.

3.6. Potencial zeta e tamanho

De forma geral, quase todos os materiais macroscópicos ou particulados em contato com um líquido adquirem uma carga elétrica em sua superfície. A interface de uma superfície ou de uma partícula coloidal carregada eletricamente, juntamente com os íons existentes no líquido próximo à interface e que estão sob a influência do campo de força causado pelas moléculas da superfície da partícula, formam uma camada difusa de íons chamada dupla camada elétrica (ARAÚJO et al., 2010).

A dupla camada elétrica é uma camada difusa de íons formada próxima à interface de uma superfície ou de uma partícula coloidal e na solução, onde existe uma diferença de densidade de cargas que gera uma diferença de potencial elétrico na interface da partícula coloidal a uma distância “x” entre interface e a solução (BERNARDES, 2012)

Quando determinada superfície sólida entra em contato com uma solução aquosa, esta tenderá a adquirir cargas em sua superfície. Essa aquisição de carga pode ser devido a inúmeros processos, tais como, à ionização de grupos funcionais da superfície, adsorção preferencial de íons da solução sobre a superfície, dissolução de sólidos iônicos, dentre outros (PIRES et al., 2009; WANG et al., 2013;).

A superfície carregada afeta a distribuição dos íons em sua vizinhança, atraindo contra-íons e repelindo íons com carga de mesmo sinal, formando-se uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido. Quando se

aplica um campo elétrico neste sistema, como por exemplo, BSA-eugenol (BSA-E), estas partículas juntamente com os íons mais fortemente ligados a ela em sua dupla camada elétrica movem-se como uma unidade, e o potencial elétrico no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circundante é chamado potencial zeta (ξ), que pode ser medido experimentalmente, refletindo a carga efetiva nas partículas (PIRES et al., 2009; WANG et al., 2013;).

As técnicas convencionais para medição do potencial zeta em um determinado sistema são realizadas por meio da aplicação de um campo elétrico sobre ele. Sua velocidade é medida pela técnica Laser Doppler e é expressa como mobilidade eletroforética (μ) em $\text{m}^2 \cdot \text{V.s}^{-1}$ (HONARY; ZAHIR, 2013; PATIL et al., 2007).

Neste caso, uma dispersão, é introduzida em uma cuba com dois eletrodos e aplica-se um potencial elétrico à dispersão. As partículas com carga elétrica líquida se movem na direção do eletrodo de carga contrária, tão rapidamente quanto maior a sua carga elétrica e maior o campo elétrico aplicado (LAMEIRAS et al., 2008).

Por representar a carga efetiva nas partículas, o potencial ζ está relacionado com a força eletrostática (repulsiva ou atrativa) entre as partículas e com a estabilidade da dispersão (BEDÊ, 2010).

Desta forma, o potencial zeta pode ser considerado um fator importante para a caracterização da interação BSA-eugenol (BSA-E), uma vez que reflete a presença de moléculas com carga localizadas na interface deste sistema. Além de inferir sobre a estabilidade físico-química deste sistema.

Se o potencial zeta do sistema for relativamente elevado em módulo, as forças repulsivas tenderão a superar as forças atrativas que atraem as partículas entre si. Em contrapartida, se o potencial zeta for relativamente pequeno em módulo, as forças atrativas entre as partículas tenderá a sobrepor sobre às forças repulsivas, apresentando menor estabilidade cinética ao sistema (ROLAND et al., 2003).

A determinação do tamanho de uma partícula presente em um sistema, tal como, BSA-E, pode ser analisado por diferentes técnicas, sendo as mais reportadas a microscopia eletrônica de transmissão e o espalhamento dinâmico de luz (DLS) (ZORZI et al., 2015; BERNE; PECORA, 2003).

Dentre estes métodos, a determinação do tamanho (diâmetro hidrodinâmico) de diferentes partículas por DLS utilizando o equipamento Zetasizer Nano-ZS, é uma das técnicas mais utilizadas, por permitir a quantificação de forma rápida, simples e precisa (ZORZI et al., 2015; BERNA; PECORA, 2003).

O DLS tem sido considerado como um dos melhores métodos para uma estimativa do tamanho médio e para a verificação da distribuição de tamanho (Índice de Polidispersão -PDI-) das partículas, além de inferir a estabilidade do sistema em função do tempo de armazenamento. E é especialmente empregado para caracterizar a estabilidade de novas formulações (KLANG et al., 2012).

O índice de polidispersão (PDI), obtido pela técnica DLS, avalia a “homogeneidade” de distribuição do tamanho das partículas presentes no sistema. Esta propriedade adimensional, pode variar entre 0 a 1, grande parte dos pesquisadores reportam que valores de polidispersão $\leq 0,3$, como um valor excelente, e valores de até 0,5 como um índice aceitável de polidispersão (KAUR et al., 2008; SHAH et al., 2014).

Desta forma, a partir das análises da carga superficial (potencial zeta) e do tamanho das partículas , é possível obter informações importantes , tais como: se a formação desta interação (BSA-E) poderá ocasionar em mudanças nas propriedades de superfície, e a partir das mensurações de tamanho e potencial zeta, verificar se a estabilidade do sistema BSA-E, está sendo favorável ou desfavorável sobre determinadas condições do meio na qual serão submetidas, tal como, os diferentes valores de pH.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos, em parceria com o Núcleo de Microscopia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.1. Avaliação microbiológica

4.1.1. Suspensão de micro-organismos

Foram utilizadas células vegetativas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922 isoladas de vacas com mastite, provenientes do banco de culturas da Embrapa Gado de leite, gentilmente cedidas pelo Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

A partir das culturas puras de *S. aureus* e *E. coli* mantidas à temperatura de -80 °C em tubo Eppendorf contendo *Brain Heart Infusion* (BHI- Merck) e glicerol (80:20) foram preparadas suspensões contendo cerca de 10^8 UFC·mL⁻¹. Para o uso experimental, as suspensões de células vegetativas foram ativadas em duas repicagens consecutivas em caldo BHI, por incubação a 37 °C por 24 h. O número de micro-organismos nas suspensões foi determinado por plaqueamento pela técnica em profundidade em ágar para contagem padrão (PCA - Himedia) e incubadas por 24 h a 37 °C.

4.1.2. Preparação do nanocarreador (BSA) com eugenol

Para a preparação das dispersões foi utilizado a albumina de soro bovino (BSA) ($\geq 98\%$) e eugenol (99,0%), adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich , St Louis, EUA). A BSA na concentração de $1,50 \times 10^{-4}$ mol· L⁻¹ foi dispersa diretamente em tampão de citrato de sódio e ácido cítrico para as soluções em pH 3,5 e 5,0. Para a dispersão em pH 7,0 foi utilizada a solução tampão de

fosfato de sódio monobásico e dibásico. Todas as soluções tampões utilizadas foram preparadas em água ultrapura (Milli-Q).

Após completa dispersão da BSA em pH 3,5, 5,0 e 7,0, foram adicionadas diferentes concentrações de eugenol de acordo com os dados obtidos pela determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB). Posteriormente, as dispersões de BSA e eugenol para cada pH, foram submetidas, separadamente, em agitador mecânico a 3000 rpm por 2 h em temperatura de 20 a 25 °C. Em seguida, cada tratamento foi filtrado em membrana de celulose com poro de 0,45 µm (Millex®) e armazenados a 25 °C.

Para as análises microbiológicas, foi avaliado também o eugenol sem a presença do nanocarreador (eugenol livre: E). O eugenol na CMB foi inoculado em caldo Müller-Hinton (Himedia), previamente autoclavado e com os valores de pH ajustados para 3,5; 5,0 e 7,0 com solução de ácido clorídrico 0,1 M ou solução de hidróxido de sódio 0,1 M. As concentrações adicionadas do princípio ativo para os diferentes tratamentos foram utilizadas de acordo com a CMB.

4.1.3. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB)

A CMI foi determinada pela técnica da microdiluição de acordo com a norma *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), 2003.

A densidade ótica dos isolados de mastite bacteriano (*S. aureus* e *E. coli*) em suspensão, foi ajustada em solução salina a 0,85% para a faixa de 0,089 a 0,120 a 625 nm utilizando espectrofotômetro (Kazuaki IL227), o que corresponde ao padrão McFarland 0,5, que contém, aproximadamente, $1,0 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹.

Foram realizadas diluições seriadas de duas vezes de eugenol livre (E) e eugenol nanocarreado (BSA-E), em concentrações que variaram de 35 µL·mL⁻¹ a 0,068 µL·mL⁻¹, em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços. O volume do caldo Müller-Hinton acrescido dos antimicrobianos corresponderam a 142 µL. A suspensão bacteriana ajustada para 0,5 McFarland foi diluída (1:10) em solução salina 0,85% e 8 µL foram utilizados para inocular as microplacas, obtendo-se uma concentração inicial de, aproximadamente, $5,0 \times 10^5$ UFC·mL⁻¹ em cada poço. As placas foram incubadas em leitora de microplacas (Multiskan

GO 1510, Thermo Scientific) a 37 °C por 18 h, com leitor de densidade ótica a 625 nm.

Além das amostras com E e BSA-E em diferentes valores de pH (3,5; 5,0 e 7,0), foram utilizadas como controle: dispersão de BSA ($1,50 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) sem eugenol, em solução tampão de citrato de sódio – ácido cítrico em pH 3,5 e 5,0 e em solução tampão de fosfato de sódio monobásico e dibásico em pH 7,0; além de solução tampão de citrato de sódio – ácido cítrico em pH 3,5 e 5,0; tampão de fosfato de sódio monobásico e dibásico em pH 7,0. A CMI foi determinada como a menor concentração que não houve multiplicação microbiana após 18 h de incubação.

As concentrações utilizadas de eugenol para amostras com E e BSA-E, variaram de 35 a $0,068 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$

Para confirmar se houve efeito bactericida ou bacteriostático, os poços classificados como negativos foram analisados. Após homogeneização em vortex, todo o líquido foi transferido para tubos Eppendorf previamente autoclavados. Cada amostra foi centrifugada a 4000 g por 5 min e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas por duas vezes com 1 mL de solução salina 0,85% (m/v) para remoção do eugenol.

O pellet obtido foi ressuspensionado em 100 μL de solução salina e todo volume foi inoculado em placas de Petri contendo ágar padrão para contagem (PCA, Himedia). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A CMB foi considerada como a menor concentração que inibiu o crescimento microbiano nas placas.

4.1.4. Determinação da viabilidade de células vegetativas de *E. coli* e *S. aureus* por citometria de fluxo após imersão em E e BSA-E

A quantificação de células vegetativas inviáveis de *S. aureus* e *E. coli* após diferentes tempos de contato com as amostras de E e BSA-E em diferentes valores de pH (3,5; 5,0 e 7,0) na CMB, foi realizada por citometria de fluxo (CMF) (BD FACSVERSE).

Cada amostra (E ou BSA-E), foi inoculada com uma concentração de aproximadamente $1,0 \times 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ de cada bactéria testada. Após a imersão

de *E. coli* e *S. aureus* em diferentes tempos (5, 15 min) foi adicionado para cada amostra 10 µL de solução de iodeto de propídio (PI) na concentração de 5,0 µg·mL⁻¹, como marcador nuclear fluorescente.

A fluorescência vermelha foi detectada por filtro 568/42 nm em comprimento de onda para excitação em 488 nm, sendo a emissão vermelha quantificada através do programa BD FACSuite.

Posteriormente, foi realizada a leitura de cada formulação em diferentes tempos, em velocidade baixa de 12 µL·min⁻¹ com 10.000 eventos previamente determinados. A quantificação de células bacterianas de cada isolado foi expressa sob a forma de percentual de células inviáveis.

4.1.5. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Para avaliar as possíveis alterações morfológicas sobre os isolados de mastite (*S. aureus* e *E. coli*) após a imersão em E; BSA-E ou solução tampão em pH 3,5 (ST), foi realizado a MEV.

Cada isolado foi ativado em caldo BHI e incubado a 37°C por 18 h. A densidade óptica (DO) foi ajustada para 0,4 a 630 nm (LIU et al., 2004). Um mililitro da suspensão bacteriana foi centrifugado a 4.000 g por 10 min. O pellet resultante foi ressuspensionado em 1mL de caldo Müeller-Hinton (controle) ou caldo Müeller-Hinton acrescido de E ou BSA-E em diferentes valores de pH (3,5; 5,0 e 7,0) na CMB ou solução tampão citrato em pH 3,5 (ST). Após incubação a 37 °C por 60 min, a suspensão foi centrifugada e as células lavadas duas vezes em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1 M, pH 7,2. Posteriormente, a suspensão bacteriana para cada isolado, foi removida de cada antimicrobiano e ressuspensionada em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, e centrifugada a 4.000 g por 10 min. Este procedimento foi repetido por duas vezes para a remoção do antimicrobiano.

Em seguida, 10 µL da suspensão de cada tratamento foram adicionadas em lamínula tratada com poly-L-lisina e espalhada, delicadamente, sobre a superfície do vidro. Após cerca de 5 min, foi realizada a fixação dos isolados com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M. As amostras ficaram imersas no fixador por 24 h sob refrigeração. Em seguida, foram realizadas seis lavagens,

de 10 min cada, em tampão PBS a 0,1M pH 7,2. A etapa da desidratação consistiu de tratamentos seriados em etanol, nas graduações de 30 °, 50 °, 70 °, 80 °, 95 ° Gay Lussak (GL), por 10 min cada e três tratamentos de 15 min, em etanol 100 ° GL. Os cupons foram transferidos para o secador ao ponto crítico (Leica, modelo CPD030) para a desidratação total. Por último, foram metalizados em *stub* (EMS, cat#. 75200) e realizado a metalização para cada amostra (BALTEC MED020 *Coating System modelo* FDU 010) com 4 nm de ouro para posterior observação ao MEV (Quanta 200, FEG/FEI 2006) e registro das imagens. A MEV foi realizada no Centro de Microscopia da UFMG.

4.1.6. Contagens de células aderidas após imersão em cupons de aço inoxidável e borracha em dispersões com E e BSA-E

Cupons de aço inoxidável (AISI 304 com polimento n° 4) e borracha de teteira utilizada em ordenhadeira mecânica foram cortados em moldes de 10 mm x 10 mm x 0,5 mm. Após a higienização, os cupons foram imersos, separadamente, em caldo BHI (Merck) esterilizado, onde foi adicionado a suspensão de *S. aureus* e *E. coli* na concentração aproximada de $5,0 \times 10^{-5}$ UFC·mL⁻¹ e incubados a 37 °C por 18 h. Após o período de incubação, os cupons foram retirados, secos à temperatura de 25 °C e imersos na CMB de cada amostra (E ou BSA-E), e na água esterilizada (controle) por 30 min. Posteriormente, os cupons foram transferidos para solução tampão de fosfato de sódio (0,1 M) por 1 min para remoção de células planctônicas, e em seguida, novamente imersos em solução tampão fosfato de sódio, com a finalidade de remoção das células sésseis por meio de agitação em vortex durante 1 min. Diluições adequadas foram preparadas a partir deste último tampão e alíquotas foram plaqueadas em ágar para contagem padrão (PCA, Himedia), sendo determinado o número de células aderidas (UFC.cm⁻²) após a imersão por 30 min de cada antimicrobiano.

4.2. Determinação do tamanho, potencial zeta (ζ) e estabilidade cinética do nanocarreador livre (BSA) e com eugenol (BSA-E)

A caracterização do nanocarreador livre (BSA) e na presença de eugenol (BSA-E) na CMB foi realizada pela mensuração do tamanho (diâmetro hidrodinâmico) e do potencial zeta para cada formulação em diferentes valores de pH (3,5; 5,0 e 7,0). As amostras foram diluídas em água Milli-Q (1:10) e analisadas com auxílio do equipamento Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd., UK).

A mobilidade eletroforética ($V \cdot m^2 \cdot s^{-1}$) foi calculada a $25 \pm 0,1$ °C, conforme a Equação 1, para partículas esféricas.

$$\mu = \frac{UE}{\omega} \quad (1)$$

em que U é a velocidade da partícula ($m \cdot s^{-1}$), ω a frequência (s^{-1}) e E o campo elétrico efetivo ($V \cdot m^{-1}$). O potencial ζ (mV) foi calculado usando a Equação de Smoluchoski (2).

$$\zeta = \frac{\eta\mu}{\varepsilon} \quad (2)$$

em que ε é a permissividade elétrica ($F \cdot m^{-1}$) e η a viscosidade do solvente ($Pa \cdot s$).

A conversão da mobilidade eletroforética em potencial ζ foi feita automaticamente pelo software de análise dos dados Zetasizer Software (Malvern. UK) Os valores de potencial ζ foram determinados em triplicata e o desvio padrão foi calculado por pelo menos 10 medidas de uma mesma amostra. O experimento foi realizado em três repetições.

Para verificar a estabilidade das formulações BSA e BSA-E na CMB, cada formulação em diferentes valores de pH (3,5; 5,0 e 7,0) foi preparada conforme descrito no item 4.1.2 e armazenadas sob 25 °C por 15 dias. Durante esse tempo, aferiu-se os parâmetros físico-químicos referentes ao tamanho (diâmetro hidrodinâmico), potencial zeta e pH, em intervalos consecutivos de 3 dias.

Os valores de pH para cada nanossistema foi determinado por medição direta no aparelho pHmetro DM20 (Digimed), à temperatura de 25 °C, sendo conduzido com duas repetições para cada tratamento. Todo o experimento foi conduzido com duas repetições para cada formulação.

4.3. Predição do modo de ligação entre eugenol e BSA em diferentes valores de pH por *docking* molecular

Para prever a ligação do eugenol com a BSA em diferentes valores de pH (3,5; 5,0 e 7,0), a estrutura do eugenol com código de acesso ZINC1411 foi obtida do banco de dados ZINC versão 12.0 (IRWIN et al., 2012). A estrutura 3D da proteína nanocarreadora (BSA), com código de acesso 4OR0 obtida por cristalografia de raio-X com resolução 2,4 Ångström (Å) foi recuperada do banco de dados PDB (Protein Data Bank) (BERMA et al., 2000). Inicialmente, as moléculas de água e demais compostos não proteicos foram removidos e os hidrogênios foram adicionados à estrutura da BSA. A distribuição das cargas dos resíduos da proteína e do ligante (eugenol) foi realizada utilizando o programa *Autodock Tools* 1.5.6 (IRWIN et al., 2012) e o modo de ligação entre proteína e ligante (BSA-E) foi predito utilizando o programa *Autodock Vina* (TROTT et al., 2010).

O perfil eletrostático da proteína sob diferentes condições de pH (3,5, 5,0 e 7,0) foi realizado inicialmente utilizando o método de Poisson-Boltzmann implementado no algoritmo APBS (*Adaptative Poisson-Boltzmann Solver*) disponível no servidor PDB2PQR (DOLINSKY et al. 2004). O perfil eletrostático da proteína foi observado no software VMD 1.9.2 (HUMPHREY et al., 1996) e as figuras foram geradas utilizando o programa PyMol 1.3 (Schrödinger, LLC).

5. DELINEAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nesta pesquisa foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC) num fatorial composto, para as análises microbiológicas.

Para a análise de adesão foi realizado um fatorial 2 x 9 x 2, ou seja: 3 fatores: bactéria (com 2 níveis: *E. coli* e *S. aureus*), formulação (com 9 níveis: antes da imersão, água, E-3,5, E-5,0, E-7,0, BSA-3,5, BSA-5,0, BSA-7,0 e ST-3,5) e superfície (com 2 níveis: aço inoxidável e borracha).

Posteriormente, estes dados foram analisados, separadamente, por meio da Análise de Variância (teste F) a 5% de probabilidade e uma vez constatados o efeito significativo do tratamento, aplicou-se então o teste Tukey, a 5% de probabilidade. Todo experimento microbiológico foi realizado com três repetições, sendo os dados analisados no programa estatístico SAS (Statistical Analysis System – SAS Institute Inc., North Carolina, USA). Versão 9.2, licenciado para Universidade Federal de Viçosa, 2013).

Nas análises de caracterização físico-química (tamanho, potencial zeta e pH) apresentou-se à média e desvio-padrão dos resultados de duas repetições.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Avaliação microbiológica

6.1.1. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

De acordo com os resultados obtidos pelo teste de CMI e CMB pelo método de microdiluição, todas as amostras com BSA-E, independente do pH avaliado, apresentaram uma CMI e CMB menores em relação ao tratamento com o eugenol livre (Tabela 2). A BSA, uma proteína com sítios hidrofóbicos e hidrofílicos, provavelmente favoreceu a uma melhor distribuição e difusão deste composto em meio aquoso, permitindo uma interação mais efetiva do eugenol sobre a superfície de *E. coli* e *S. aureus*, favorecendo à ação antimicrobiana do eugenol nanocarreado, em menores concentrações em relação ao eugenol livre.

Tabela 2 - Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) de eugenol nanocarreado (BSA-E) e livre (E) sobre isolados bacterianos mastitícos

Bactéria	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
Amostras	CMI*	CMB*	CMI*	CMB*
BSA-E 3,5	0,27	0,27	0,27	0,27
BSA-E 5,0	0,55	0,55	0,55	0,55
BSA-E 7,0	0,55	0,55	0,55	0,55
E-3,5	1,10	1,10	1,10	1,10
E-5,0	2,20	2,20	2,20	2,20
E- 7.0	2.20	2.20	2.20	2.20

* = $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$, BSA-E 3,5; 5,0 e 7,0: eugenol nanocarreado com BSA em pH 3,5; 5,0 e 7,0; respectivamente; E- 3,5; 5,0 e 7,0: eugenol livre (em caldo Mueller-Hinton.) em pH 3,5, 5,0 e 7,0, respectivamente.

A atividade antibacteriana de óleos essenciais e ou de seus componentes como o eugenol pode ser classificada entre forte, moderada e fraca, que corresponde a CMI de até 500; entre 600 e 1.500; e acima de 1.600 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (ALIGIANNIS et al., 2001)

Todas as amostras com BSA-E apresentaram forte ação inibitória sobre *S. aureus* e *E. coli* (CMI < 500 $\mu\text{g/mL}$), e com menores concentrações do princípio ativo em relação ao eugenol livre (E) Amostras com BSA ($1,50 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e soluções tampões (0,1 M) sem eugenol em valores de pH 3,5, 5,0 e 7,0, foram utilizados como controle.

De acordo com os valores obtidos, foi possível constatar que a CMI não diferiu da CMB para o mesmo valor de pH para a amostra com o eugenol livre (E) ou nanocarreador (BSA-E), entre as bactérias gram-positiva e gram-negativa.

LV et al. (2011), ao avaliarem os efeitos antimicrobianos *in vitro* de diferentes óleos essenciais, demonstraram que o óleo essencial de manjerição (*Ocimum basilicum*), cujo componente majoritário foi o eugenol (>60%), obtiveram a mesma CMI para *S. aureus* e *E. coli* ($1,25 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) pela técnica de microdiluição. Chen et al. (2009) ao avaliaram a CMI e CMB de eugenol em caldo soja Tripticaseína- TSB sobre *S. aureus* e *E. coli*, também obtiveram os mesmos valores para CMI e CMB para ambos os isolados ($0,9 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Tais resultados respaldam a ação antimicrobiana de amplo espectro do eugenol, como evidenciado neste estudo.

A atividade antimicrobiana do eugenol é atribuída a sua capacidade de permeabilizar e interagir com a membrana celular de forma não específica, favorecendo sua ação de amplo espectro, além de diferentes estudos relacionarem o eugenol com o aumento do transporte de potássio e de (ATP) para fora das células (GILL; HOLLEY, 2006; HEMAISWARYA; DOBLE, 2009; ZHENG et al., 2013).

A amostra BSA-E em pH 3,5 apresentou nas mesmas condições das demais formulações, a menor CMI e CMB ($0,27 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Tabela 2), sugerindo uma melhoria da ação bactericida do eugenol com o meio ácido.

Importante ressaltar, que independentemente do pH avaliado, todas as amostras com BSA-E apresentaram ação bactericida com concentrações menores do princípio ativo em relação ao eugenol livre (E).

De acordo com os dados obtidos (Tabela 2) o baixo pH do meio, ao favorecer uma possível melhoria do efeito antibacteriano, favoreceu a uma menor concentração de eugenol necessária para a inativação dos isolados mastíticos, sendo a concentração duas vezes menor em comparação as amostras de BSA-E em pH 5,0 e 7,0.

Davidson et al. (2005) avaliaram a ação antimicrobiana de eugenol livre e nanocarreado em micelas constituídas de tensoativo não-iônico (Surfynol® 485W) em diferentes valores de pH (5,0, 6,0 e 7,0) sobre *E. coli* e *Listeria monocytogenes*. Os autores reportaram que em pH 5,0 as micelas sem eugenol demonstraram pequena inibição sobre os isolados bacterianos, mas a adição de 0,2% (m/m) de eugenol conduziu à inibição completa de ambos os micro-organismos, além de demonstrarem que a CMI aumentou com a elevação do pH, variando de 0,2, 0,5 e 0,5% de eugenol para os pH 5,0, 6,0 e 7,0; respectivamente. A maior atividade do eugenol em micelas foi atribuída ao aumento da solubilidade do antimicrobiano pela presença de surfactantes sobre os isolados bacterianos.

Em todas as amostras contendo apenas a BSA sem eugenol, não foi detectado ação bactericida nem bacteriostática sobre *S. aureus* e *E. coli*, independente do pH do meio.

Pela análise da CMI e CMB, foi verificada ação bacteriostática para a solução tampão em pH 3,5 sem eugenol (controle). Este resultado pode estar relacionado ao requerimento de energia dos micro-organismos em baixo pH, que é maior que a energia requerida em valores de pH próximo a neutralidade.

Em condições de baixo pH do meio, as células precisam gastar energia e alteram as atividades metabólicas para eliminar os prótons em excesso e manter o pH interno. Dessa forma, há alteração do transporte de nutrientes devido à alteração na permeabilidade de membrana e redução da força próton motora (HUANG; CHEN, 2006; PARISH et al., 2003; RAYBAUDIMASSILA et al., 2009).

Além deste fator, embora a parede celular seja uma estrutura dinâmica, que pode se adaptar às mudanças fisiológicas do meio, mantendo seu metabolismo ativo, o baixo valor de pH, tende a inviabilizar a multiplicação celular (LV et al., 2011), demonstrando assim que o pH pode favorecer a uma possível ação bacteriostática.

Diferentes estudos demonstram que o uso de óleos essenciais nanocarreados em sistemas de distribuição, tais como, nanoemulsões, lipossomas, micelas poliméricas, dentre outros, tendem a melhorar a atividade de óleo essencial ou seus componentes, principalmente pela melhor distribuição e solubilidade do princípio ativo hidrofóbico em meio aquoso (DONSI et al., 2012; DONSI, et al., 2014; GHOSH, et al., 2014; MCCLEMENTS; RAO, 2011; SHAH; DAVIDSON; ZHONG, 2013; WEISS et al., 2009).

Shah et al. (2014) avaliaram a ação antimicrobiana de eugenol em nanocápsula de proteína isolada de soro de leite conjugado com maltodextrina pelo método de emulsão-evaporação, sobre *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* em leite bovino. Os autores observaram que o eugenol encapsulado, obteve melhor eficiência antimicrobiana em relação ao eugenol livre (disperso em caldo de soja Trypticaseína - TSB), quando adicionado ao leite. Eles reportaram que a melhor ação antimicrobiana do eugenol encapsulado se deve a uma maior solubilidade e distribuição mais uniforme do princípio ativo na fase aquosa, além de uma menor interação do eugenol nanocarreado com componentes presentes no leite, tais como gordura e proteína (SHAH; DAVIDSON; ZHONG, 2014).

6.1.2. Avaliação da viabilidade de *E. coli* e *S. aureus* por citometria de fluxo após imersão em E e BSA-E em diferentes valores de pH

Ao avaliar a viabilidade de células microbianas expostas a diferentes fatores de estresses, tal como o uso de antimicrobianos, a heterogeneidade existente referente aos diferentes estados metabólicos e fisiológicos de determinada estirpe não é considerado pelas técnicas de análises microbiológicas convencionais, pois nem todas as células em questão, sobrevivem igualmente quando submetidas a condições adversas (BOOTH, 2002; JORDAN et al., 1999). Neste contexto, a análise por citometria de fluxo (CMF), ao analisar cada célula bactéria individualmente, permite maiores informações sobre a viabilidade celular.

Para a análise de CMF foi utilizado como marcador fluorescente, o iodeto de propídio (IP), para a detecção de células não viáveis de *E. coli* e *S.*

aureus após imersão por 5 e 15 min. e 18 horas; em E e BSA-E em diferentes valores de pH (3,5;5,0 e 7,0).

Após 5 min de imersão dos isolados de mastite, foi observado uma maior porcentagem de células inviáveis para as amostras BSA-E em relação ao eugenol livre. O controle (sem imersão em E ou BSA-E) de *E. coli* e *S. aureus* na ausência e presença de IP estão representados na Figura 4.

Independente do pH e da bactéria testada, todos as amostras com BSA-E, exceto BSA-E 7,0 para *S. aureus*, apresentam porcentagem de células inviáveis maior do que 99% (Figura 5). Demonstrando o rápido efeito bactericida do eugenol nanocarreado (BSA-E) em relação ao eugenol livre (E).

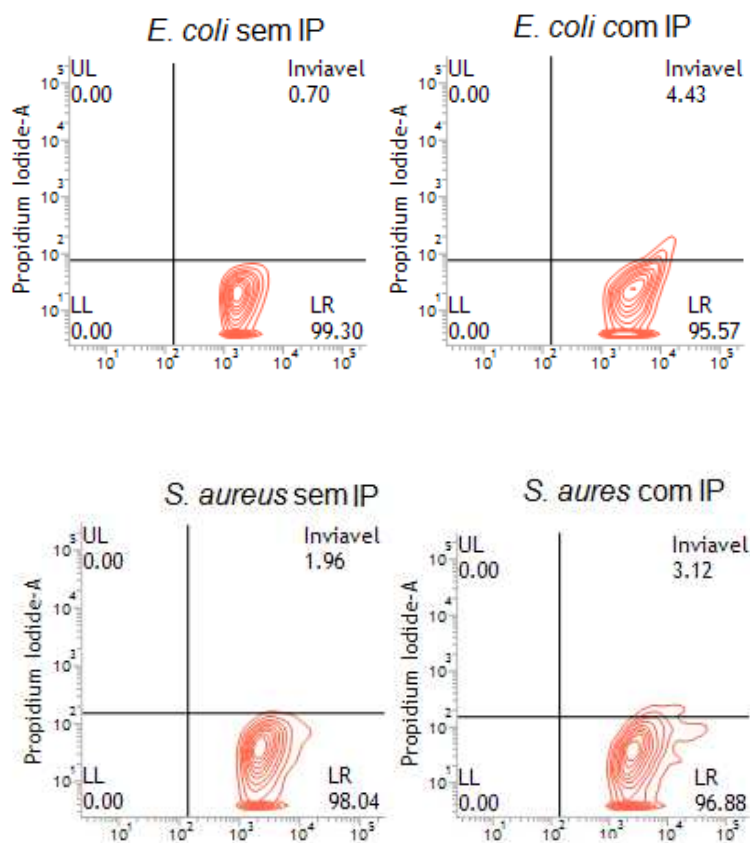


Figura 4- Porcentagem de células inviáveis de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em pH 3,5.

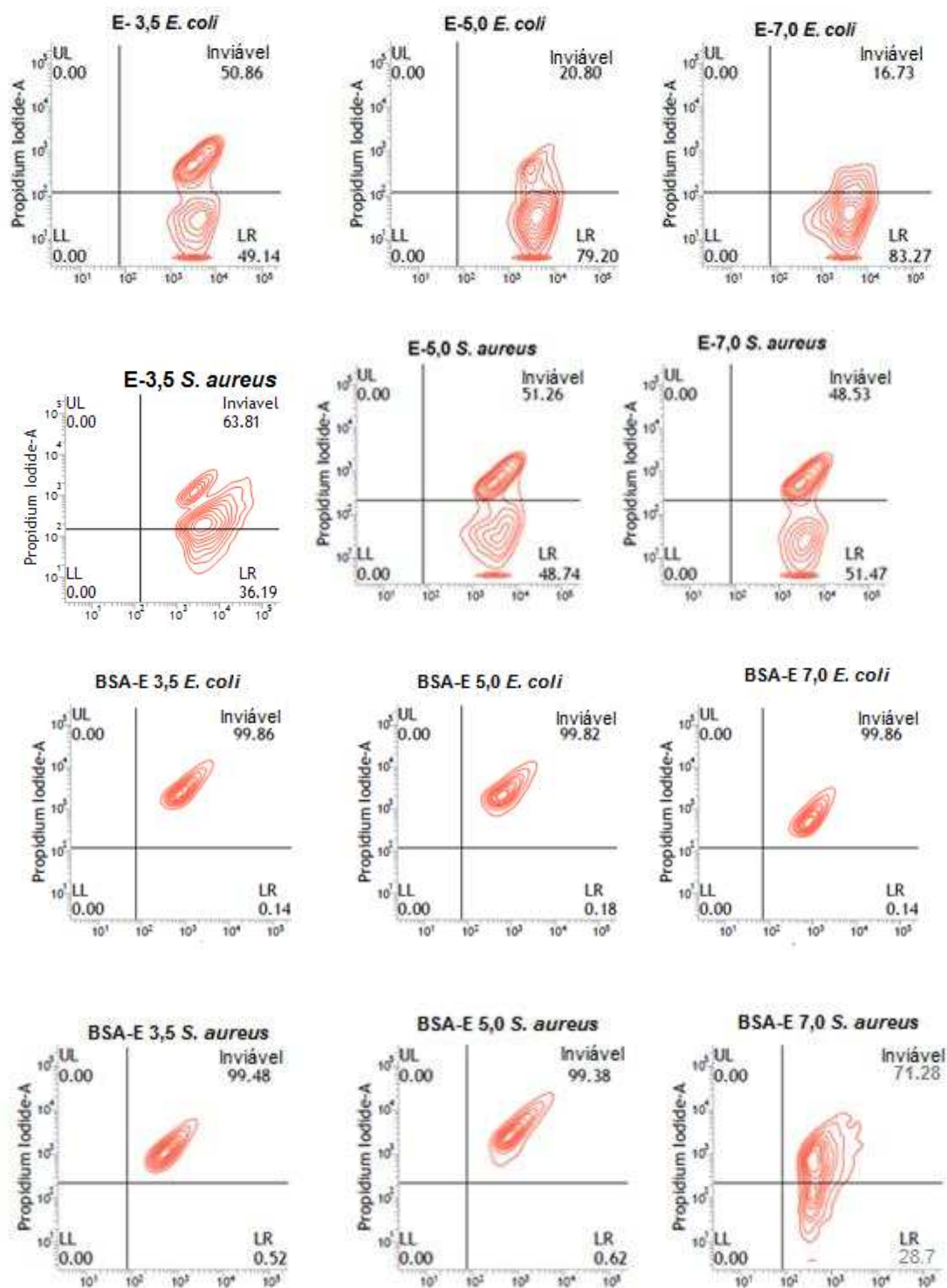


Figura 5 - Porcentagem de células inviáveis após a imersão por 5 min de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em eugenol livre (E) e nanocarreado (BSA-E) em diferentes valores de pH.

Como pode ser observado na Figura 5, a atividade bactericida de E foi influenciada pelo pH do meio, sendo maior em menores valores de pH. Além disso, o eugenol livre foi mais efetivo sobre *S. aureus* em relação a *E. coli*.

A amostra BSA-E, após 5 min de imersão demonstrou elevada ação antimicrobiana sobre as células de *E. coli* (99,86%; 99,82% e 99,86% em pH 3,5; 5,0 e 7,0; respectivamente) e *S. aureus* (99,48% e 99,38% em pH 3,5 e 5,0; respectivamente). A BSA-E em pH 7,0 para *S. aureus*, demonstrou uma inativação de 71,28%, demonstrando que em pH próximo a neutralidade, este isolado necessita de maior tempo de contato com o antimicrobiano para uma maior inativação.

A maior ação bactericida do BSA-E corrobora com os resultados dos testes microbiológicos realizados anteriormente, que demonstraram que a formulação BSA-E apresentou uma forte ação bactericida, provavelmente resultante da uma distribuição mais uniforme e melhor difusão do antimicrobiano em meio aquoso.

Hammer; Heel (2012) avaliaram por CMF as alterações na permeabilidade da membrana celular em *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* após exposição em carvacrol, 1,8-Cineol, eugenol, terpinen-4-ol e cinamaldeído, na CMI de cada composto, por 5 e 30 min. Os autores demonstraram que o eugenol foi o único composto a permeabilizar a membrana celular de forma significativa, para todos os micro-organismos após 5 min de exposição (78,11%; 90% e 95%, para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. faecalis*, respectivamente). Esses valores corroboram com os resultados de nossa pesquisa, além de evidenciar um dos possíveis mecanismos de ação do eugenol, ou seja, a ruptura da membrana celular.

O efeito antimicrobiano de eugenol pode estar interligado a presença do grupamento fenólico em sua estrutura, que poderia penetrar através da membrana celular e manter os efeitos inibitório e bactericida (DAS et al. ,2016).

Para verificarmos se o maior tempo de imersão dos isolados de mastite em eugenol livre (E) poderia propiciar o aumento da porcentagem de células inviáveis, realizamos o mesmo procedimento pela técnica de CMF, porém com

tempo de imersão de 15 min sobre *E.coli* e *S. aureus*, como evidenciado na Figura 6.

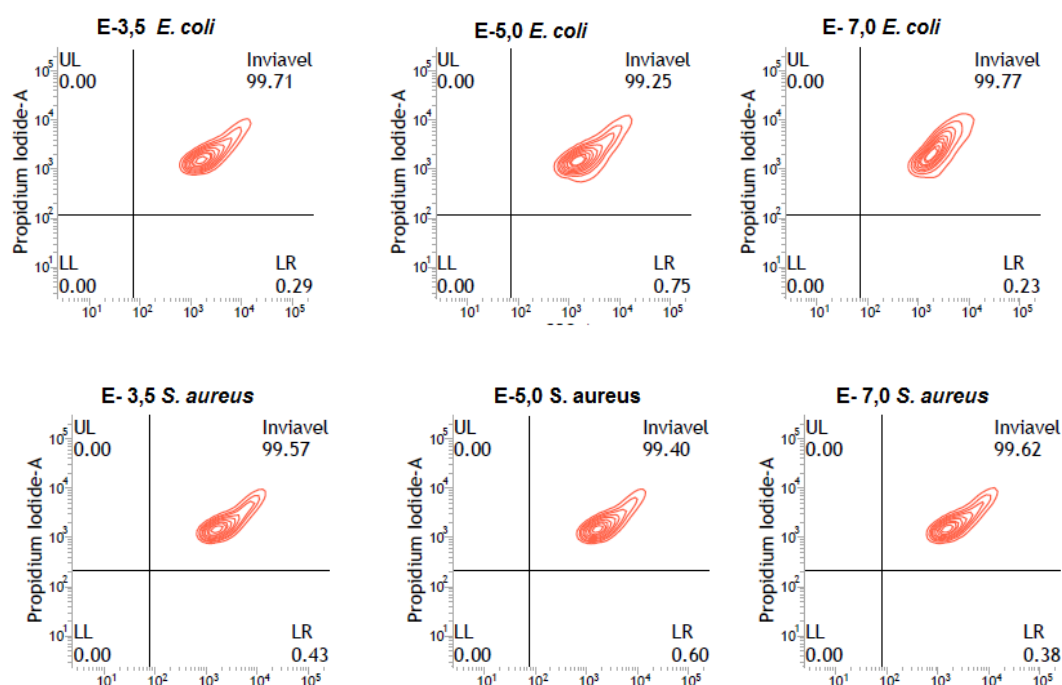


Figura 6 - Porcentagem de células inviáveis após a imersão por 15 min de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* sobre eugenol livre (E) e nanocarreado (BSA-E) em diferentes valores de pH.

O maior tempo de imersão (15 min) com eugenol livre em diferentes valores de pH propiciou a inviabilidade celular sobre os isolados bacterianos (> 99,9%), independente da influência do pH do meio e da estrutura da parede celular. Este resultado demonstra a importância do tempo de contato no efeito bactericida da amostra com E

A imersão em solução tampão citrato em pH 3,5 (ST- 3,5) demonstrou pequena porcentagem de células inviáveis (16,12% e 19,69% para *E. coli* e *S. aureus*.; respectivamente), mesmo após 18 h de imersão sobre os isolados mastítico. Esse fato reforça sua ação bacteriostática, como encontrado em nossa pesquisa pelo teste de microdiluição (Figura 7).

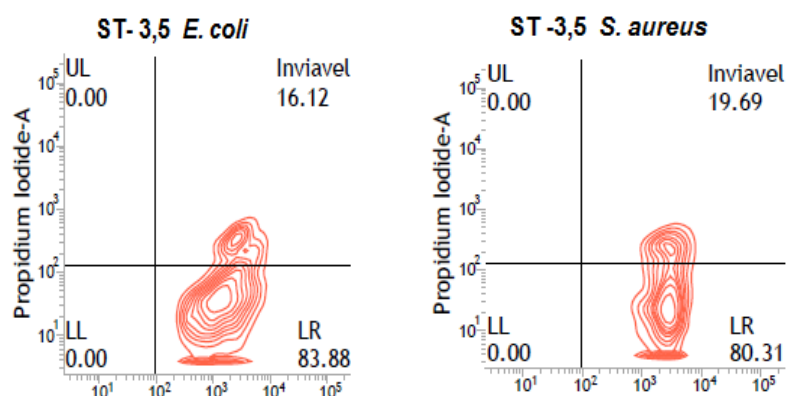


Figura 7 - Porcentagem de células inviáveis após a imersão em de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em solução tampão citrato com pH 3,5 (ST-3,5) por 18 h.

Para confirmar que os valores obtidos pelo teste de microdiluição foram realmente bactericidas, avaliou-se por CMF todas as amostras após a imersão por 18 h, ou seja, o mesmo tempo de contato que os isolados bacterianos foram expostos para análise da CMI e CMB (Figura 8).

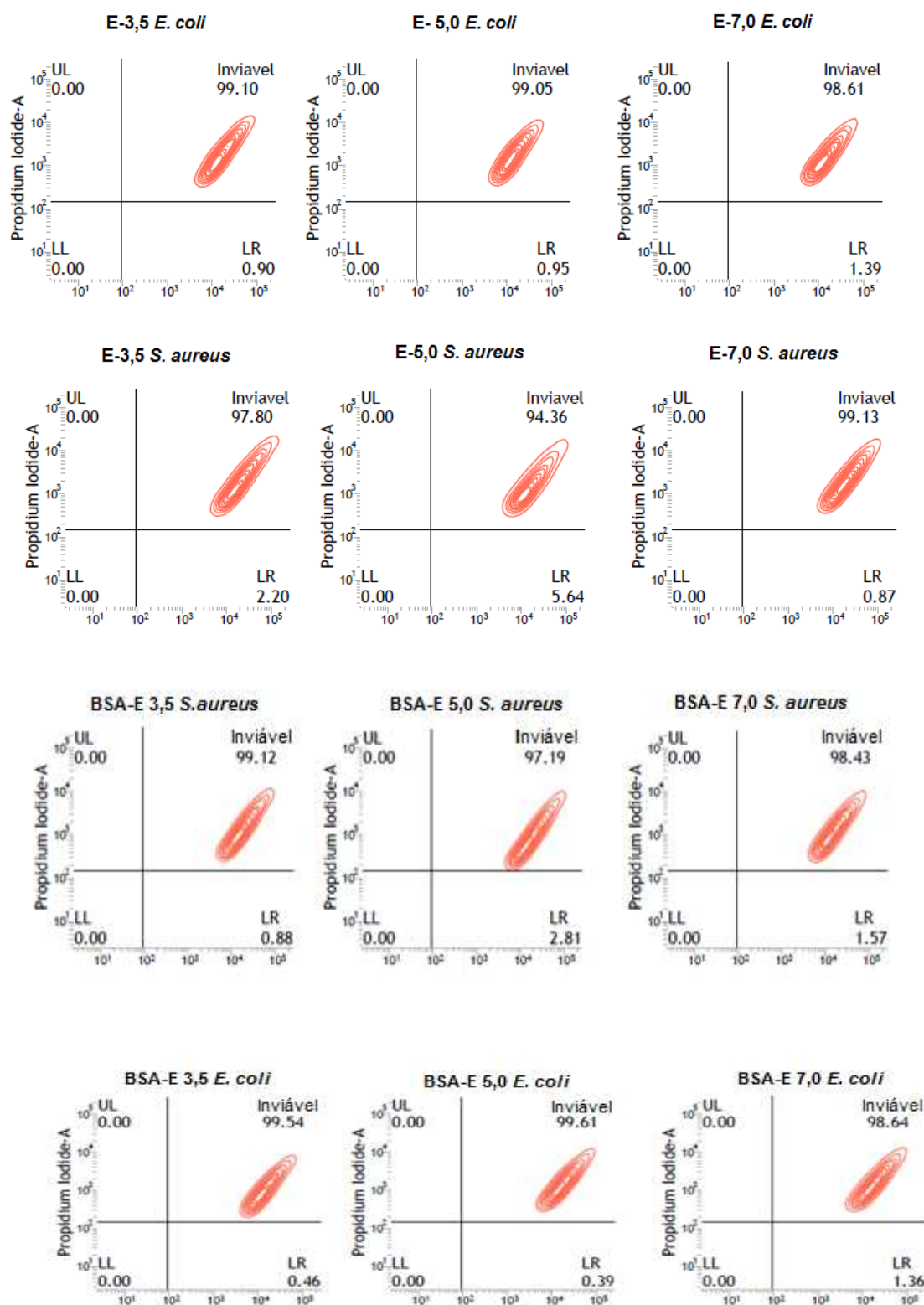


Figura 8 - Avaliação da porcentagem de células inviáveis de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* após imersão por 18 h. em eugenol livre (E) e nanocarreado (BSA-E) em diferentes valores de pH.

De acordo com os resultados obtidos foi possível constatar que eugenol apresenta elevada atividade bactericida sobre os isolados de mastite bovina gram-positivo e gram-negativo, promovendo a perda da integridade da membrana celular, sendo a técnica de CMF com a marcação por fluorescência por IP eficaz para a avaliação da viabilidade celular.

Apesar dos benefícios encontrados em nossa pesquisa na utilização de eugenol livre sobre os isolados bacterianos, sua elevada hidrofobicidade e volatilização, torna-se um entrave para a sua utilização em sistemas aquosos. Neste contexto, nanocarreadores, como a BSA, visando a veiculação desta substância apresenta-se como uma alternativa viável para o controle e prevenção da mastite bovina contagiosa e ambiental, além de sua possível utilização em outros segmentos da área de alimentos. Além disso, foi demonstrado que em tempo de contato menor (5 min), a BSA-E foi mais efetiva que o eugenol livre.

6.1.3. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Visando elucidar um dos possíveis mecanismos de ação do eugenol e corroborar com os dados obtidos pela análise em CMF, avaliou-se a morfologia da superfície celular de *E. coli* e *S. aureus* por microscopia eletrônica de varredura (MEV), após a imersão por 30 min destes isolados nas formulações que apresentaram ação bactericida.

Pode-se observar que todas as amostras na CMB apresentaram mudanças morfológicas e prováveis rupturas na membrana celular (Figuras 9 e 10). Observa-se também que os tratamentos com BSA-E proporcionaram maiores alterações nas superfícies celulares quando comparadas ao eugenol livre, independente do pH e da bactéria avaliada.

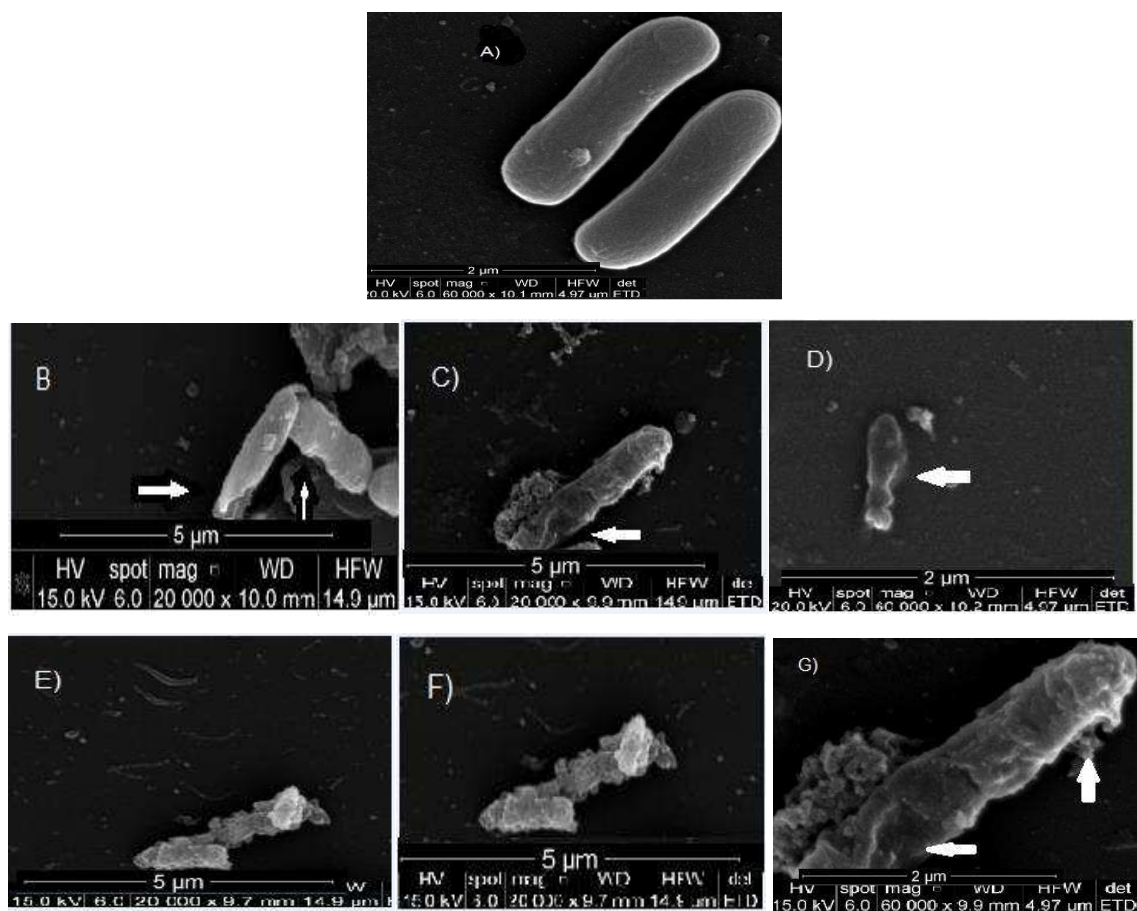


Figura 9 - Fotomicrografias de células de *Escherichia coli* após a exposição a diferentes tratamentos: A= controle; B= E- 3,5; C= E-5,0; D= E=7,0; E= BSA-E 3,5; F= BSA-E 5,0; G= BSA-E 7,0. Setas indicando prováveis deformações morfológicas.

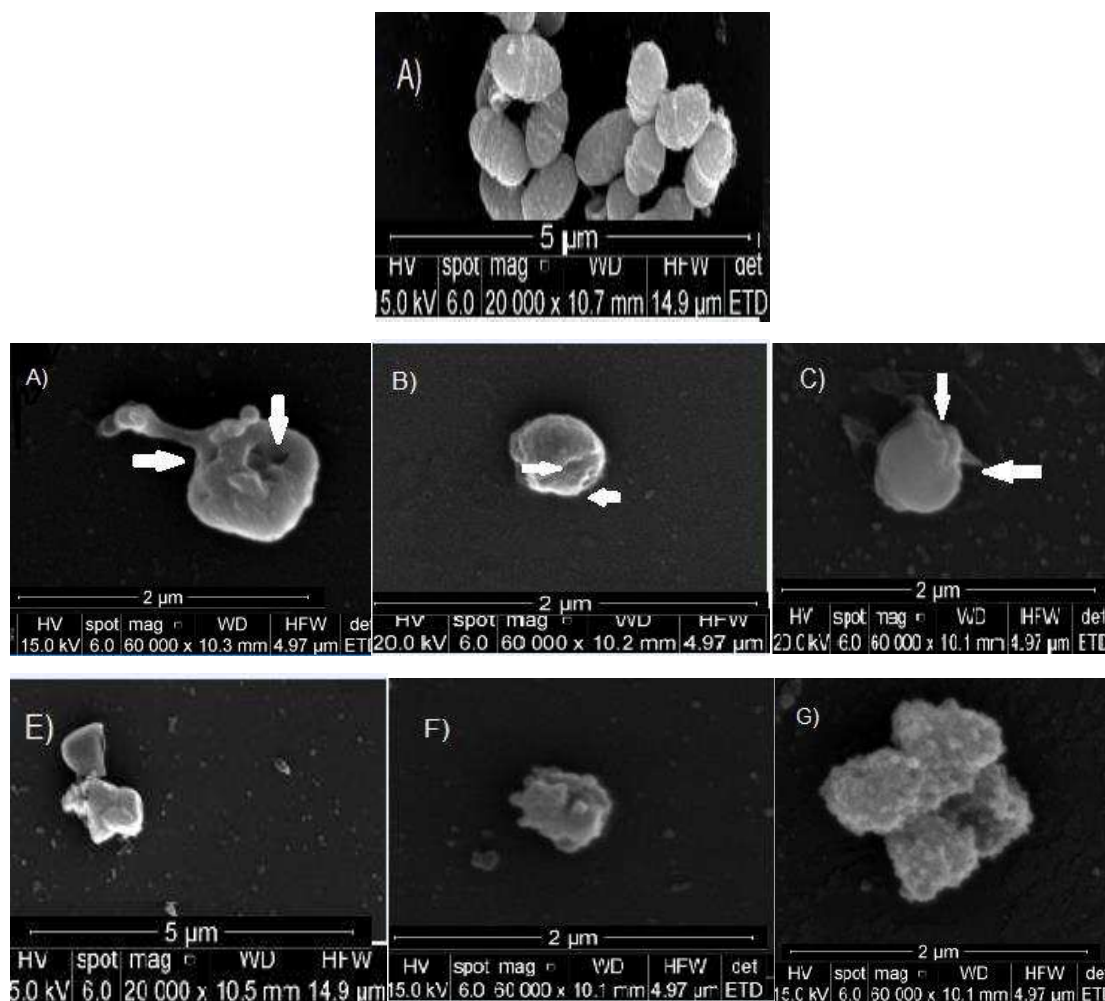


Figura 10 - Avaliação morfológica de *Staphylococcus aureus* por MEV após o condicionamento em diferentes tratamentos: A= controle; B= E- 3,5; C= E-5,0; D= E-7,0; E= BSA-E 3,5; F= BSA-E 5,0; G= BSA-E 7,0. Setas indicando prováveis deformações morfológicas.

A superfícies das células bacterianas não tratadas com o antimicrobiano natural permaneceram intactas e com características morfológicas típicas de uma célula microbiana. Porém, as células tratadas com eugenol foram severamente danificadas. Algumas células mostraram acentuada desuniformidade e a presença de fragmentos e lacunas, reforçando a possível fragmentação da membrana celular como o principal mecanismo de ação do antimicrobiano sobre bactérias. Resultados semelhantes foi encontrado por Das et al. (2016), ao analisarem a morfologia da membrana celular de estirpes multirresistentes de *S. aureus* quando submetidas a diferentes concentrações de eugenol.

Os resultados obtidos pela técnica de MEV embasam os resultados obtidos pelas demais metodologias microbiológicas, demonstrando a forte ação bactericida do eugenol, especialmente na forma nanocarreada.

As mudanças morfológicas ocasionadas pelo eugenol evidenciam o aumento significativo na permeabilidade da membrana, que pode afetar o transporte citoplasmático, propiciando a incapacidade destas células em regular adequadamente o transporte através da membrana celular, resultando em sua inativação (DAS et al., 2016).

Hemaiswarya e Doble (2009) também reportaram danos à membrana celular em *S. aureus* e *E. coli* como possível mecanismo de ação do eugenol. Demonstraram ainda que os danos na membrana celular em ambas as estirpes, aumentaram a permeabilidade não seletiva da membrana.

6.1.4. Contagens de células aderidas após imersão de superfícies de aço inoxidável e borracha em dispersões com E e BSA-E

Após constatar-se a eficiência antibacteriana e um dos possíveis mecanismos de ação do eugenol livre (E) e nanocarreado (BSA-E), avaliou-se a eficiência de diferentes substâncias (água, E-3,5; E-5,0; E-7,0; BSA-3,5; BSA-5,0; BSA-7,0 e ST-3,5) na remoção de células vegetativas de *S. aureus* e *E. coli* aderidas em cupons de aço inoxidável e borracha de teteira utilizada em ordenhadeira mecânica, após 30 min de imersão dos cupons.

Observou-se que a interação tripla, bactéria x amostra x superfície, e as interações duplas, bactéria x superfície e bactéria x amostra não foram significativas ($p > 0,05$). Desta forma, o fator bactéria (*E. coli* e *S. aureus*) foi analisado separadamente. E o fator formulação e superfície foram analisados em conjunto ($p < 0,05$).

A adesão de *E. coli* e *S. aureus* foi diferente ($p < 0,05$) para todas as situações estudadas (superfície e amostra). Sendo assim, como se tem somente dois níveis do fator bactéria, não foi preciso realizar o teste de Tukey, e, observando os valores das médias tem-se que *E. coli* aderiu mais nas diferentes circunstâncias ($3,45 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$) (amostra e superfície) que *S. aureus* ($3,19 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$).

Os micro-organismos gram-negativos tendem a apresentar maior facilidade de adesão em superfícies em comparação aos gram-positivos, pois estes apresentam pili, fímbrias e flagelos, bem como a membrana externa. *S. aureus* não apresenta membrana externa ou estruturas para a motilidade (BOARI et al., 2009; MEI et al., 2003). Tais considerações podem ter favorecido a maior adesão de *E. coli* em relação a *S. aureus*, independente da formulação e superfície utilizada.

Flach et al. (2005), ao analisarem bactérias da família *Enterobacteriaceae*, constataram que *E. coli* apresentava uma maior produção de fatores de adesão, tais como, cápsula, adesinas e flagelos. Estes fatores microbiológicos tendem a favorecer a maior adesão bacteriana.

A presença da camada externa em *E. coli*, constituída por proteínas, lipopolissacarídeos e fosfolipídeos, tende a favorecer a uma interação e difusão mais lenta das formulações testadas na membrana celular, podendo favorecer a adesão desta bactéria em superfícies, uma vez que a integridade da membrana celular poderá estar mais preservada em relação a superfície de *S. aureus*.

Além destes fatores, o estado fisiológico das células no momento da análise também poderá influenciar significativamente no processo de adesão, o que pode ter ocasionado a maior adesão de *E. coli*.

Ao analisarmos a interação conjunta, amostra x superfície, constatou-se que a amostra com BSA-E independentemente do pH foi o mais eficiente para remoção de bactérias aderidas em comparação a todas as demais substâncias ($p < 0,05$). Além disso, promove uma menor adesão à superfície do aço inoxidável em relação a superfície de borracha ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Media e desvio padrão do número de células bacteriana aderidas (log UFC·cm²) em aço inoxidável e borracha após 30 min de imersão em eugenol livre (E) e nanocarreado (BSA-E) em diferentes pH

Amostra	Superfície	
	Aço	Borracha
Al*	5,83 ± 0,97 Aa	6,77 ± 0,89 Ab
Água	5,12 ± 0,45 Ba	5,83 ± 0,51 Bb
E-3,5	2,65 ± 0,38 Ca	3,25 ± 0,44 Cb
E-5,0	2,71 ± 0,21 Ca	3,28 ± 0,33 Cb
E-7,0	2,83 ± 0,53 Ca	3,31 ± 0,48 Cb
BSA-E 3,5	1,46 ± 0,42 Da	1,82 ± 0,53 Db
BSA-E 5,0	1,54 ± 0,27 Da	1,80 ± 0,21 Db
BSA-E 7,0	1,59 ± 0,57 Da	1,34 ± 0,51 Db
ST-3,5	4,00 ± 0,61 Ea	4,31 ± 0,55 Eb

. * Al: antes da imersão. Valores na mesma coluna, seguidos por mesma letra maiúscula, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. Valores na mesma linha, seguidos por mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Não há para superfícies de processamento de alimentos, um padrão, mas recomendações que devem ser utilizadas como referências, para as condições higiênicas. Segundo *American Public Health Association* (APHA), uma superfície é considerada corretamente higienizada, quando o número de mesófilos aeróbios é até 2 UFC·cm⁻². Por ser considerada uma recomendação rígida, outras instituições como a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) admitem contagens de até 50 UFC·cm⁻² de mesófilos aeróbios à superfície (ANDRADE, 2008; SÁ, 2013).

Sobre tais aspectos, somente as formulações utilizando BSA-E, independentemente do pH, atenderam as recomendações OPAS e OMS de até 50 UFC·cm⁻², equivalente a log 1,70 UFC·cm⁻² de mesófilos aeróbios, para a superfície de aço-inoxidável, demonstrando ser uma alternativa viável para a inativação e controle de patógenos relacionados a mastite bovina, visto que o aço inoxidável está presente, majoritariamente, em tubulações, equipamentos e utensílios utilizados durante o processo de ordenha.

Batista et al. (2014) ao avaliar a ação de diferentes óleos essenciais sobre *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) aderidas em superfície de aço inoxidável, verificaram uma redução de 5,40 log UFC·cm⁻² após contato de 30 min, com óleo essencial de *E. caryophyllus*, sendo capaz de eliminar as células

viáveis enumeráveis por contagem em placas de *P. aeruginosa*. Os autores reportam que a forte ação bactericida, que favoreceu a eliminação de células aderidas, se deu pela presença de seu componente majoritário, o eugenol, composto fenólico que tem demonstrado atividade bactericida contra diversos micro-organismos.

Apesar do valor de redução decimal (RD) reportado no estudo supracitado ser superior a RD encontrada neste trabalho para o eugenol livre (em torno de 2,5 RD), o estudo corrobora em relação a forte ação bactericida desta substância.

A maior adesão bacteriana na superfície da borracha em relação ao aço inoxidável ($p < 0,05$) pode estar associada a maiores irregularidades e porosidade intrínseca desta superfície, dificultando a interação de BSA-E e de todas as demais substâncias testadas, uma vez que as características da superfície, como carga elétrica, hidrofobicidade e topografia, possuem papel importante no processo de adesão e remoção de células aderidas (PLOUX et al., 2007).

Segundo Flint et al. (2000), uma superfície com maior rugosidade e ou porosidade, como a borracha, pode ser preferencialmente colonizada por proporcionar aos micro-organismos locais de proteção ao estresse do ambiente, da turbulência do líquido que envolve a superfície e da atividade de antimicrobianos. O que pode ter favorecido a maior adesão de *E. coli* na superfície da borracha neste estudo.

Embora a amostra BSA-E na superfície da borracha não esteja no limite recomendado pela OPAS e OMS, é preconizado que três reduções decimais (RD) (99,9%) são necessárias para considerar uma solução de sanitizante eficiente para remoção de células aderidas (ANDRADE, 2008).

Neste contexto a amostra com BSA-E também demonstra uma possibilidade para a utilização em superfície de borracha de teteira, por apresentar uma RD $> 4,0$ (99.99%), demonstrando ser uma alternativa promissora para esta superfície e consequentemente para o controle da mastite infecciosa e ou ambiental.

Os danos causados na membrana celular de *S. aureus* e *E. coli*. submetidas a BSA-E ou E estão bem documentadas neste trabalho pela técnica de CMF e MEV, colaborando com o possível mecanismo que favoreceu às

reduções de células aderidas nas superfícies estudadas, principalmente com BSA-E.

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais, e ou seus componentes vem sendo avaliada frente a biofilmes microbianos, visando à possível utilização desses compostos como agentes sanitizantes na indústria de alimentos. Os resultados encontrados nos trabalhos já realizados são promissores, entretanto, ainda divergem entre si, demonstrando a necessidade de realização de mais estudos sobre o assunto (CHORIANOPOULOS et al., 2008).

No presente estudo, observou-se que BSA-E apresentou resultados satisfatórios na remoção de células aderidas quando comparado a todos os demais tratamentos, inclusive com o eugenol livre (E), com diferenças significativas nas reduções decimais (> 4 RD).

Dessa forma, a formulação BSA-E pode ser considerada uma alternativa promissora visando a inativação e controle bacteriano relacionado a mastite bovina contagiosa e ou ambiental, podendo também, após novos estudos, ser utilizados em diferentes segmentos da indústria de alimentos, visando o controle de micro-organismo patogênicos e ou deterioradores.

7.0 Caracterização e estabilidade físico-química do nanocarreador

7.1 Tamanho e Potencial Zeta (ζ)

Após o preparo de cada amostra, medidas de tamanho (diâmetro hidrodinâmico) e do potencial zeta (ζ) foram realizadas para as amostras BSA livre (BSA) e BSA com eugenol (BSA-E) na CMB, em diferentes valores de pH 3,5; 5,0 7,0; que representam valores abaixo, próximo e acima, respectivamente, do ponto isoelétrico (pI) da BSA (pI = 4,6).

Foi possível constatar que a diminuição do pH favoreceu o aumento de tamanho das partículas para todas as formulações. No pH 3,5, a BSA e BSA-E apresentaram tamanho de $10,66 \pm 0,13$ nm e $11,03 \pm 0,015$ nm, respectivamente, sendo superior em relação ao pH 5,0 ($7,39 \pm 0,18$ nm e $7,95 \pm 0,014$ nm) e pH 7,0 ($8,12 \pm 0,29$ nm e $8,17 \pm 0,13$ nm) (Figura 11).

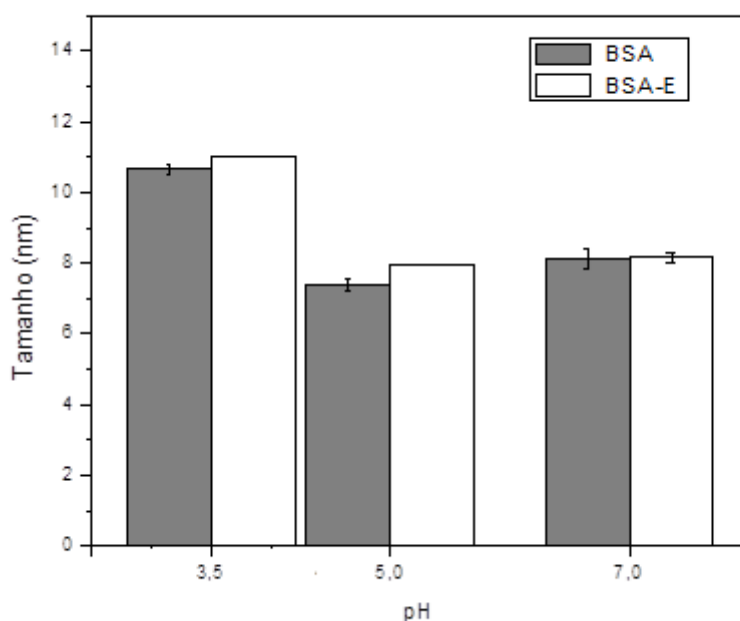


Figura 11 - Tamanho (nm) da BSA livre (BSA) e com eugenol na CMB (BSA-E) em função de diferentes valores de pH 3,5; 5,0 e 7,0 (Tempo 0).

No intervalo de pH entre 4,5 a 4,0 a BSA encontra-se sob uma forma de transição, sendo que a forma flexível (F), mais favorável quando ocorre uma redução abrupta do pH para valores menores que 4,0. A transição da forma F na conformação da BSA para a E (expandida) favorece o desnovelamento das α -hélices no domínio I, e a maior flexibilização (desdobramento) do domínio III (transição da forma N para F) (FERREIRA, 2009; MICHNIK, et al., 2005; NUNES, 2016).

Dessa forma, em pH 3,5, o maior tamanho verificado, pode ter sido favorecido pela conformação mais flexível da proteína. Em contrapartida, em pH 5,0, a BSA encontra-se próxima ao seu pI, apresentando uma conformação mais enovelada e compacta, estando mais próxima de sua conformação nativa (N), propiciando a um tamanho menor das partículas. No pH 7, acima do pI, a BSA retorna para uma conformação menos enovelada, que pode ter favorecido a um tamanho maior em comparação ao pH 5,0.

Li et al. (2016), ao verificarem o efeito do pH (3,0, 4,7 e 7,0) sobre a BSA (0,30 g.L⁻¹) em água ultrapura pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (Zetazise), constataram que o tamanho das partículas não tiveram mudanças

significativas entre os pH 4,7 e 7,0, porém, a diminuição do pH de 4,7 para 3,0 propiciou ao aumento de $10,1 \pm 0,5$ nm para $12,4 \pm 0,6$ nm no tamanho da proteína (LI et al., 2016).

Os autores reportaram que, valores de pH mais distantes do pI da proteína, podem proporcionar uma conformação menos enovelada, favorecendo ao aumento de partículas agregadas, resultante das interações entre as cadeias terminais da BSA, levando ao aumento de tamanho, principalmente em valores de pH abaixo do pI (LI et al., 2016). Dessa forma, no pH 3,5, o maior tamanho observado pode ser devido a uma mudança na conformação da BSA, que pode ter proporcionado à formação de partículas agregadas.

O pH é um fator que pode promover mudanças na densidade de cargas da BSA devido a protonação/desprotonação de grupos ionizáveis, bem como em sua carga líquida. Estas mudanças podem influenciar tanto as interações entre os segmentos da cadeia polipeptídica da BSA quanto às interações que esta proteína realiza com outras moléculas (KUN et al., 2009).

Dessa forma, é possível verificar que o pH do meio alterou o potencial zeta da BSA e BSA-E. (Figura 12).

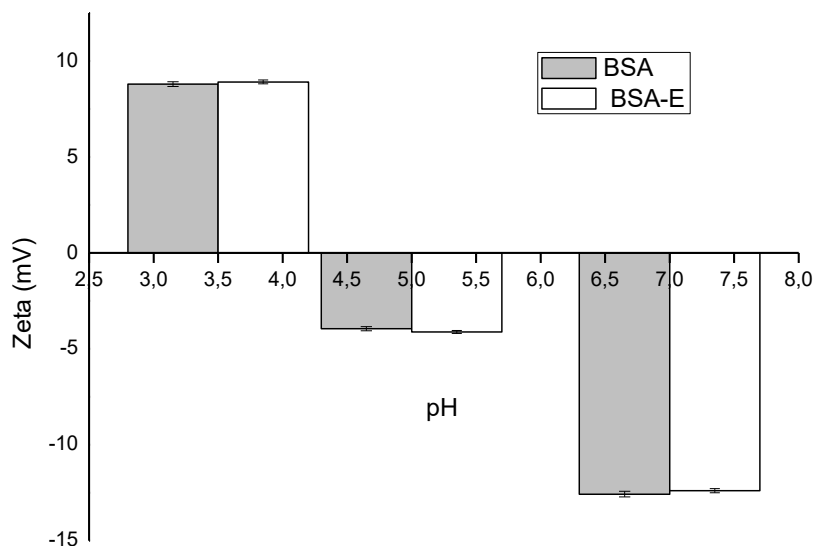


Figura 12 - Potencial zeta (mV) da BSA livre (BSA) e com eugenol (BSA-E) em função de diferentes valores de pH 3,5, 5,0 e 7,0 (Tempo 0).

Em pH 3,5 a carga líquida para BSA e BSA-E foram respectivamente de $+ 8,8 \pm 0,14$ mV e $+ 8,91 \pm 0,15$ mV, demonstrando que para ambos os sistemas ocorreu uma predominância de grupamentos de aminoácidos básicos protonados e ou pela desprotonação de aminoácidos ácidos, na cadeia polipeptídica, não ocorrendo diferença do potencial zeta entre a amostra BSA e BSA-E (Figura 12).

Em valores de pH abaixo do pI da BSA, os resíduos de aminoácidos básicos, tendem a estar presentes na superfície molecular da proteína, enquanto os resíduos de aminoácidos ácidos ficam distribuídos no interior da molécula de BSA, prevalecendo uma carga líquida positiva (LI et al., 2016).

A elevação do pH tende a favorecer o aumento de carga líquida negativa, provavelmente, pela desprotonação/protonação de grupamentos presentes na cadeia polipeptídica pelo menor enovelamento da BSA, permitindo, preferencialmente, que aminoácidos de caráter ácido, que se encontravam mais interiorizados no pH 5,0; ficassem mais acessíveis à superfície da proteína, favorecendo a sua desprotonação.

Importante ressaltar, que o potencial zeta não variou acentuadamente entre BSA e BSA-E, em um mesmo valor de pH, sugerindo desta forma, que os diferentes valores de potencial zeta para os pH 3,5, 5,0 e 7,0 foram influenciados principalmente pelo tipo de conformação (nativa, de transição ou expandida) e pela predominância de grupamentos protonados/desprotonados presente na superfície da BSA em determinado pH.

Nunes (2016), ao analisar o efeito da interação entre a BSA e o cinamato de metila (CM), pela mesma técnica de DLS, sobre as propriedades de superfície da proteína em diferentes valores de pH (3,5, 5,0 e 7,4) evidenciou que a interação BSA-CM não teve contribuição de interação eletrostática, mas decorrente da mudança na conformação da BSA em função do pH, corroborando com os resultados obtidos em nossa pesquisa.

A estabilidade de nanoestruturas pode ser influenciada, por diferentes fatores, tais como, adsorção e, ou, ionização/ deionização de substâncias ou de moléculas ativas à superfície. Para monitorar esta estabilidade cinética, o tamanho da partícula, o potencial zeta, e o pH são parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados (CALVO, et al., 1996).

Desta forma avaliou-se a estabilidade para as amostras BSA e BSA-E na CMB, a partir do tamanho (diâmetro hidrodinâmico), potencial zeta, e do pH por 15 dias consecutivos, com intervalos de 3 dias, sobre as amostras em diferentes valores de pH (3,5, 5,0 e 7,0) armazenadas sob 25 °C.

Após 15 dias de armazenamento a 25 °C, as amostras BSA tiveram um pequeno aumento de tamanho de 2,38%; 1,73% e 1,58% para os pH 3,5, 5,0 e 7,0, respectivamente. Em contrapartida, as formulações BSA-E, apresentaram um aumento de 0,45%; 0,1% e 0,78%; para os pH 3,5, 5,0 e 7,0, respectivamente (Figura 13).

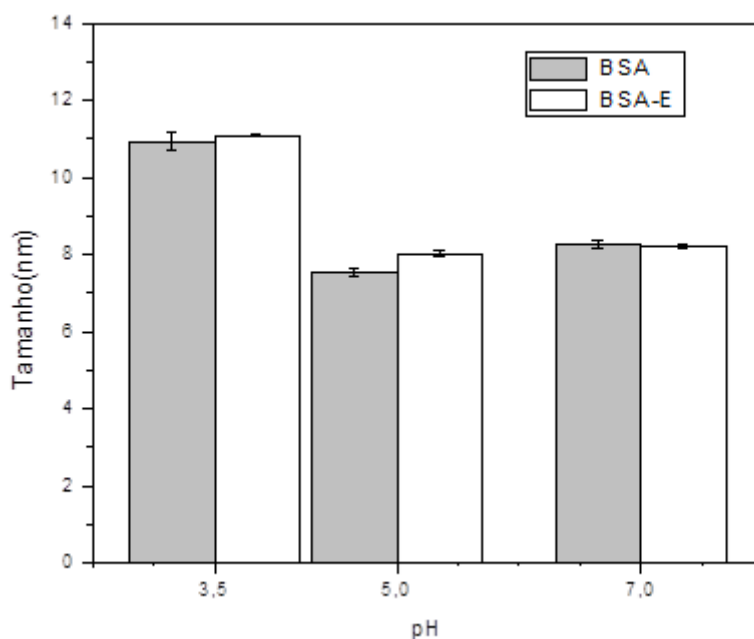


Figura 13- Valor médio do tamanho (nm) para BSA e BSA-E em função de diferentes valores de pH 3,5, 5,0 e 7,0; após 15 dias de armazenamento a 25 °C.

De acordo com os dados obtidos (Figura 13), sugere-se que a amostra BSA-E independentemente do pH do meio, demonstrou que o eugenol com a BSA pode auxiliar em uma maior estabilidade para a proteína em meio aquoso,

equalizando com diferentes estudos que demonstraram que diferentes ligantes bioativos, ao interagir com a BSA propiciaram maior estabilidade para a proteína (CHATURVEDI et al., 2015; FANG et al., 2011; GUAN; WU; ZHONG, 2016; YADAV et al., 2014)

O índice de polidispersão (PDI), obtido pela técnica DLS, avalia a homogeneidade de distribuição do tamanho das partículas presentes no sistema. Esta propriedade adimensional, pode variar entre 0 a 1, sendo que valores de polidispersão $\leq 0,3$, considerado como um valor excelente e valores de até 0,5 como um índice aceitável de polidispersão (KAUR et al., 2008; SHAH et al., 2014).

No presente estudo todas as formulações apresentaram-se como sistemas monodispersos durante o tempo de armazenamento, com índice de polidispersão média de 0,270, respaldam uma boa distribuição de tamanho.

O potencial zeta, por contribuição de forças repulsivas entre as partículas, provavelmente também contribuiu para a estabilidade e melhor homogeneidade das partículas em todas as formulações avaliadas.

Após armazenamento por 15 dias, foi constatado uma pequena variação em relação ao potencial zeta (Figura 14). Para as amostras BSA, o ξ em relação ao tempo 0, variou de + 8,80 para + 8,61 ($\pm 0,23$) mV; de -3,95 para -3,82 ($\pm 0,11$) mV e -12,57 para -12,39 ($\pm 0,11$) mV; para os pH 3,5, 5,0 e 7,0 respectivamente. Para as amostras BSA-E, o ξ variou de + 8,91 para + 8,80 ($\pm 0,04$) mV; de -4,12 para -4,01 ($\pm 0,06$) mV e -12,39 para -12,22 ($\pm 0,05$) mV, para os pH 3,5, 5,0 e 7,0.

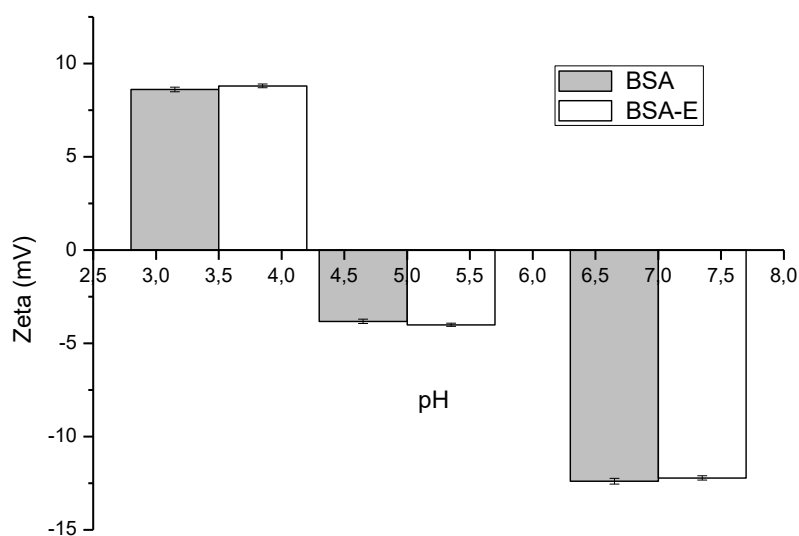


Figura 14 - Valor médio do potencial zeta (mV) para BSA e BSA-E em função de diferentes valores de pH 3,5, 5,0 e 7,0; após 15 dias de armazenamento a 25 °C.

A pequena variação do potencial zeta para todas as amostras, corroboram com a estabilidade do pH observada durante 15 dias para as diferentes formulações (BSA e BSA-E), sugerindo que o pH do meio não favoreceu em mudanças na estrutura da BSA, nem tão pouco à ionização do eugenol na superfície da BSA ou no meio aquoso.

O valor médio de pH para as diferentes formulações (BSA ou BSA-E) se manteve praticamente estável após 15 dias (Figura 15).

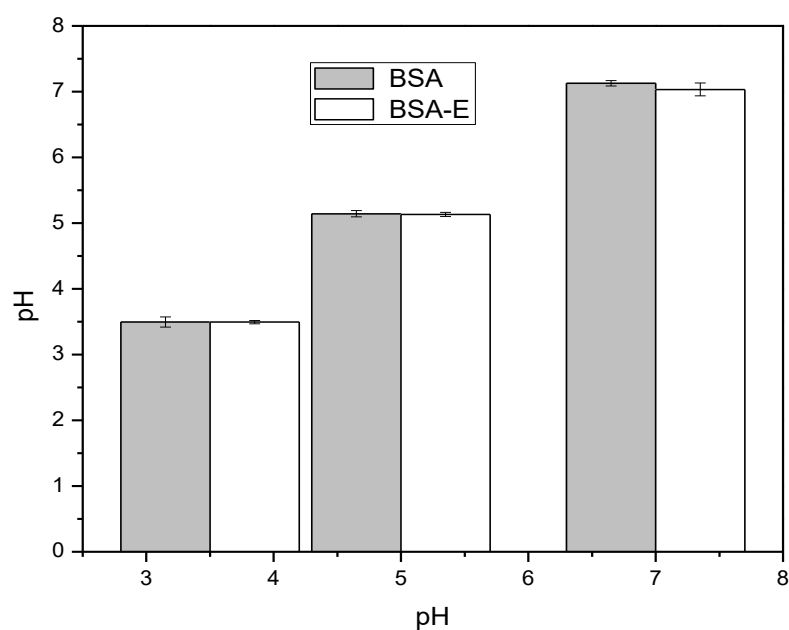


Figura 15 - Valor médio do pH para BSA e BSA-E em função de diferentes valores de pH 3,5, 5,0 e 7,0 durante 15 dias de armazenamento a 25 °C.

Dessa forma, a formulação BSA-E demonstra ser uma alternativa viável para o controle bactericida de isolados de *E. coli* e *S. aureus* isolados de vacas com mastite bovina, apresentando boa estabilidade cinética em diferentes valores de pH do meio por 15 dias a 25 °C.

7.2. Predição do modo de ligação entre eugenol e BSA em diferentes valores de pH por *docking* molecular

A técnica por *docking* molecular é uma forma efetiva para a predição de interação ligante-proteína para fundamentar os resultados experimentais, em relação a interação eugenol e BSA.

A BSA é constituída principalmente por estruturas do tipo α -hélice, sendo formada pela presença de três domínios homólogos independentes (I, II, III). Cada domínio compreende dois subdomínios A e B (IIA, IIIA e IB), denominados como “sítios” I, II e III, respectivamente (JATTINAGOUDAR et al., 2016; HE; CARTER, 1992).

No presente estudo, o programa *Autodock* 4.2.0 foi utilizado para calcular o modo de ligação entre o eugenol e a BSA. Os resultados de ligação molecular revelaram que o eugenol está localizado no interior de uma região formada pela interação entre os três domínios (I, II e III) (Figura 16- A).

Este “bolsão” de interação é composto principalmente de aminoácidos hidrofóbicos (VAL-481; LEU-197; ALA-209; LEU-343; LEU-210 e TRP-213); localizados principalmente no domínio II; e básicos (ARG-483; ARG-198) incluindo interação de hidrogênio entre o hidrogênio da hidroxila do eugenol (OH⁻) e a cadeia lateral da arginina (Figura 16- B).

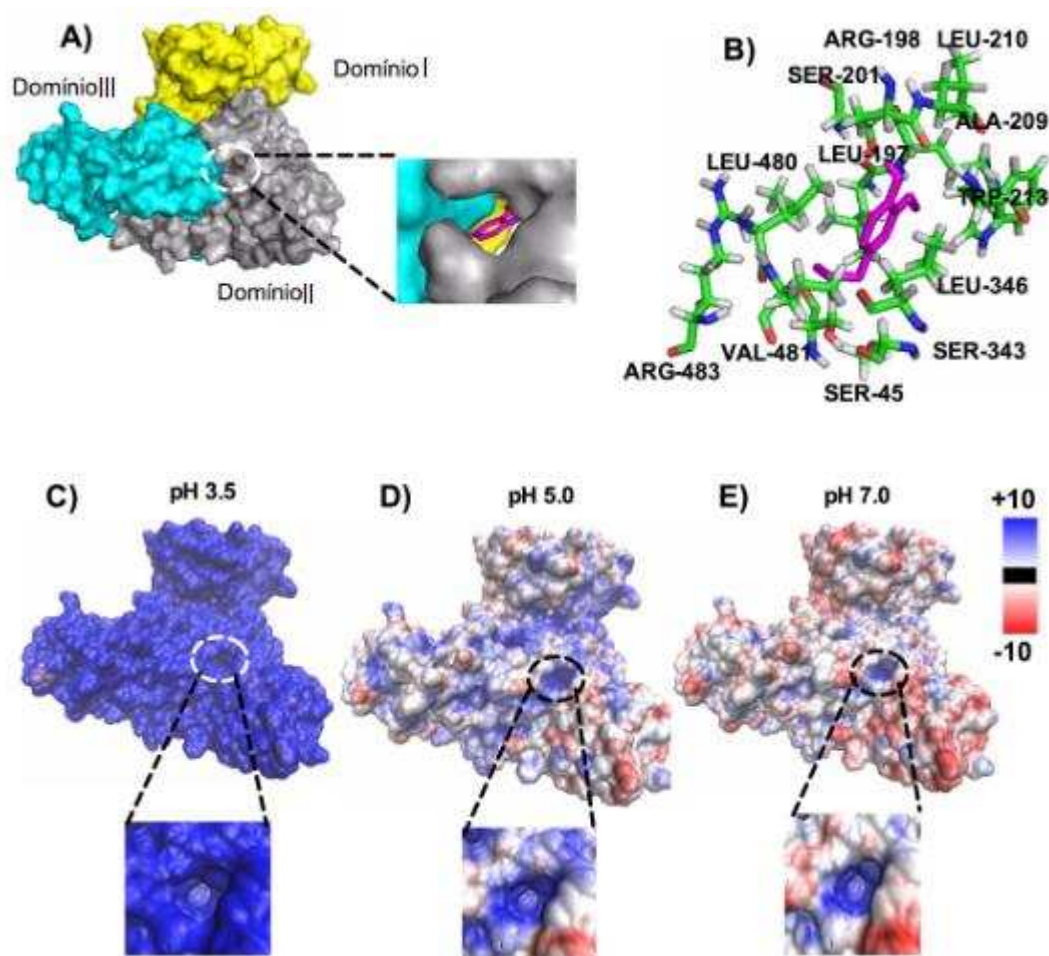


Figura 16 - Predição do modo de ligação entre eugenol e BSA por *docking*. A) Conformação de melhor interação predita entre o eugenol (rosa) e a cavidade formada pelos três domínios do BSA (amarelo, ciano e cinza); B) Aminoácidos do sítio de interação entre BSA e eugenol (rosa); C) Mudança do potencial eletrostático da superfície da proteína em pH = 3,5; D) Mudança do potencial eletrostático da superfície da proteína em pH = 5,0 e E) Mudança do potencial eletrostático da superfície da proteína em pH = 7,0.

A interação oferecida pelo sítio I ocorre principalmente por meio de interações hidrofóbicas, enquanto no sítio II envolve uma combinação de interações hidrofóbicas, ligação de hidrogênio e interações eletrostáticas. Desta forma, os locais de interação de albumina com moléculas exógenas ou endógenas de caráter hidrofóbico, como o eugenol, pode ser favorecido, principalmente, pela presença dos subdomínios II e IIIA, conhecido como sítios I e II, respectivamente (BANIPAL, et al., 2017; TAYEH et al., 2009).

Portanto, o resultado obtido pela predição molecular demonstra que a interação entre o eugenol e a BSA foi termodinamicamente favorável,

corroborando com os resultados microbiológicos *in vitro*, que demonstraram uma melhor ação bactericida para a formulação BSA-E.

A partir do método de Poisson-Boltzmann implementado no algoritmo APBS, foi possível avaliar as mudanças do potencial eletrostático da superfície da proteína ao longo de diferentes condições de pH (Figura 16 C -E).

A interação BSA-E em pH 3,5 favoreceu a predominância de cargas positivas provenientes da protonação/desprotonação de aminoácidos básicos e ácidos, principalmente pela arginina.

Para a ligação BSA-E não foi verificado diferença acentuada em relação ao potencial eletrostático para os pH 5,0 e 7,0, com predominância de cargas negativas, resultantes provavelmente, da menor protonação de aminoácidos básicos e maior desprotonação de aminoácidos ácidos, equalizando com os resultados experimentais, onde o potencial zeta foram de $+ 8,61 \pm 0,23$ mV; $- 3,82 \pm 0,11$ mV e $- 12,32 \pm 0,11$ mV; para os pH 3,5; 5,0 e 7,0, respectivamente.

Neste contexto, a predição do modo de ligação entre eugenol e BSA por *docking* molecular no presente trabalho, fornece informações úteis sobre os possíveis resíduos específicos da BSA envolvidos nas interações com o eugenol, possibilitando uma melhor compreensão da proteína-ligante a nível molecular, corroborando com os resultados experimentais microbiológicos e físico-químico (potencial zeta).

8. CONCLUSÃO

A incorporação de eugenol em BSA apresentou ação bactericida sobre bactérias gram-positiva e gram-negativa, com CMB inferior ao eugenol no estado livre em todos os valores de pH analisados (3,5, 5,0 e 7,0). As análises de CMF e MEV mostraram que os danos gerados pela membrana celular é possivelmente a principal forma de ação sobre os isolados bacterianos de mastite.

A remoção de *S. aureus* e *E. coli* pelo teste simulado em cupons de aço inoxidável e borracha de teteira utilizada em ordenhadeira mecânica, após a imersão em BSA-E independentemente do pH; sugere que o eugenol nanocarreado, pode vir a ser utilizado como eficiente sanitizante para o controle do processo de adesão.

As amostras BSA-E independentemente do pH do meio demonstraram estabilidade cinética durante 15 dias de armazenamento. Além disso, a análise por *docking* molecular foi capaz de predizer que a interação entre o eugenol e a BSA foi termodinamicamente favorável.

Neste contexto, sugere-se que o eugenol nanocarreado, é um antibacteriano efetivo para o controle e prevenção de *S. aureus* e *E. coli* isolados de vaca com mastite bovina contagiosa e ambiental. Além de futuras aplicações em outros segmentos nas áreas alimentícias, especialmente na perspectiva atual de encontrar alternativas viáveis contra o crescente mecanismo de resistência aos antibióticos convencionais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, A.C. et al. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p.565-573, 2016.
- AHMAD, A. et al. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 1178–1184, 2010.
- AIRES, T. A. C. P. Mastites em Bovinos: caracterização etiológica, padrões de sensibilidade e implementação de programas de qualidade do leite em explorações do Entre-Douro e Minho. **Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**, Lisboa, 2010
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 49(9), p.4168-70, 2001.
- ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; LIMA, J. C. Adesão e formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, cap.4, p. 185 – 228, 2008.
- ANGIENDA, P. O.; HILL, D. J. The effect of sodium chloride and pH on the antimicrobial effectiveness of essential oils against pathogenic and food spoilage bacteria: Implications in food safety. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8(4), p.222–227, 2011.
- ANTON, N. et al. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, n. 1–2, p. 44–52, 2007.
- ARAÚJO, E. A.; ANDRADE, N. J.; SILVA, L. H. M.; CARVALHO, A. F.; RAMOS, A. M.; SILVA, C. A. S. Aspectos coloidais da adesão de microrganismos. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1940 -1948, 2010.
- BARCELOUX, D.G. Medical Toxicology of Natural Substances. Foods, Fungi, Medicinal Herbs, **Plants and Venomous Animals**. Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2008
- BARDIAU, M. et al. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, p.181–186,2013.
- BANI-YASEEN, A. D. Spectrofluorimetric study on the interaction between antimicrobial drug sulfamethazine and bovine serum albumin. **Journal of Luminescence**, v. 131, n. 5, p. 1042–1047, 2011.

BANIPAL, T. S.; KAUR, A.; BANIPAL, P. K. Physicochemical aspects of the energetics of binding of sulphanilic acid with bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 170, p. 214–225, 2017.

BARKEMA, H. W. et al. Invited review : The role of contagious disease in udder health. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4717–4729, 2009.

BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited Review : The Role of Cow , Pathogen , and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine Staphylococcus aureus Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 6, p. 1877–1895, 2006.

BATISTA, N. N. et al. Formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* sobre aço inoxidável em contato com leite e seu controle por óleos essenciais. **Alimentos e Nutrição**, v. 25, (1), 2014.

BEDÊ, P. M. **Produção e caracterização de nanopartículas poliméricomagnéticas para utilização biomédica**. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, RJ, 2010.

BEN AMOR, K. et al. Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead *Bifidobacterium* cells during bile salt stress. **Applied and Environmental Microbiology** , v.68, p. 5209-5216, 2002.

BERNARDES, P. C. **Modificação de membranas de polissulfona usada em processos de filtração de água para reduzir o biofouling**. 2012. 116p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

BERNE, B. J., PECORA, R., 2003. Dynamic Light Scattering: With Applications to Chem-istry, Biology, and Physics. **Dover Publications**, Inc., Mineola, NY, 2003.

BERMAN, H. M., et al. The Protein Data Bank. Res., 28, 235–242, 2000. **Nucleic Acids Research**, v.28(1), p. 235-42, 2000.

BEY-OULD SI SAID, Z. et al. Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of Eucalyptus globulus fruits. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 167–175, 2016.

BLUM, S. E.; LEITNER, G. Genotyping and virulence factors assessment of bovine mastitis Escherichia coli. **Veterinary Microbiology**, v. 163, n. 3–4, p. 305–312, 2013.

BOARI, C. A. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.

BOERHOUT, E. M. et al. Reisolation of *Staphylococcus aureus* from bovine milk following experimental inoculation is influenced by fat percentage and specific immunoglobulin G 1 titer in milk. p. 4259–4269, 2016.

BOOR, K. J. Mastitis-Causing *Streptococci* Are Important Contributors to Bacterial Counts in Raw Bulk Tank Milk. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 12, p. 2644–2650, 2004.

BOOTH, IR.. Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p.19-30, 2002.

BOVI, G. G. **Óleo de buriti (*Mauritia flexuosa* L.) nanoemulsionado: produção por método de baixa energia, caracterização físico-química das dispersões e incorporação em bebida isotônica**. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos)- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2015.

BRANDELLI, A. Nanostructures as Promising Tools for Delivery of Antimicrobial Peptides. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 731–741, 2012.

BRADLEY, A.J. Bovine mastitis: an evolving disease. **Veterinary Journal, Les Ulis**, v.164, p.116-128, 2002.

BRADLEY, A. J., GREEN, M. J. The aetiology of clinical mastitis in a cohort of Somerset dairy herds. **Veterinary Record**, p.683-686, 2001.

BRASIL, B.B. **Avaliação de clusters da composição química do leite no estado de Goiás**. 2016. 97p. Tese (Tese em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

BRASIL (2005) Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/resolucao_conama_357.pdf>. Acessado em: 24 de novembro de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-americana de saúde. Nanotecnologia: **A interação célula e nanopartículas**. Brasília, p. 89-102, 2011.

BURVENICH, C. et al. Cumulative Physiological Events Influence the Inflammatory Response of the Bovine Udder to *Escherichia coli* Infections During the Transition Period 1. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. July 2006, p. E39–E54, 2007.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p.223-53, 2004.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015.

CALVO, JOSEÄ L. VILA-JATO, A. M. J. A. Comparative in Vitro Evaluation of Several Colloidal Systems , Nanoparticles , Nanocapsules , and Nanoemulsions , as Ocular Drug Carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 5, p. 530–6., 1996.

CAMUSSONE, C. M. et al. Immune response and functional role of antibodies raised in heifers against a Staphylococcus aureus CP5 lysate and recombinant antigens vaccine formulated with Iscom Matrix adjuvant. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2014.

CAPURRO, A. et al. Identification of potential sources of Staphylococcus aureus in herds with mastitis problems. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 1, p. 180–191, 2010.

CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of serum albumins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 153–203, 1994.

CASSOL, D. M. et al. A. Introdução agentes da mastite diagnóstico e tratamento. **A Hora Veterinária**, v. 29, n.175, 2010.

CERIZE, N. N. P. Estudos de sistemas nanocarreadores para o ácido 5 aminolevulínico com Aplicação na Terapia Fotodinâmica. **Tese de Doutorado** (Faculdade de Ciências Farmacêuticas) – USP, Ribeirão Preto – SP, p. 48, 2012.

CHAGAS, L. G. S. et al. Ocorrência de mastite bovina causada por *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* e *Candida sp.* em uma propriedade rural no município de Indianópolis – Minas Gerais, Brasil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 1007-1014, 2012.

CHAIEB, K. et al. The Chemical Composition and Biological Activity of Clove Essential Oil , *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L . Myrtaceae): A Short Review. **Phytother Res**, v. 506, n. March, p. 501–506, 2007.

CHATURVEDI, S. K. et al. Elucidating the interaction of limonene with bovine serum albumin: a multi-technique approach. **Molecular BioSystems**, v. 11, p. 307–316, 2015.

CHEN, X. et al. Effects of clove essential oil and eugenol on quality and browning control of fresh-cut lettuce. **Food Chemistry**, v. 214, p. 432–439, 2017.

CHEN, F. et al. Antioxidant and Antibacterial Activities of Eugenol and Carvacrol-Grafted Chitosan Nanoparticles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 1, p. 30–39, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos:** norma aprovada. 8. ed. M2-A8, v. 23, n. 1, 2003.

CHORIANOPOULOS, N. G. et al. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1586-1696, 2008.

CHORILLI, M. et al. Lipossomas em formulações dermocosméticas. **Infarma**, v. 16, n. 7–8, p. 75–79, 2004.

CONDO, S.; SALA, F. J. Effects of Several Factors on the Heat-Shock-Induced Thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3225–3232, 1997.

DAS, B.; MANDAL, D.; DASH, S. et al. Eugenol Provokes ROS-Mediated Membrane Damage- Associated Antibacterial Activity Against Clinically Isolated Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **Infectious Diseases: Research and Treatment**, v. 9, p. 11-19, 2016.

DAVEY, HM, WINSON, MK.. Using flow cytometry to quantify microbial heterogeneity. **Current Issues in Molecular Biology**, v.5, p.9-15, 2003.

DEVI, K. P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107–115, 2010.

DAVIDSON, P. M. et al. Growth inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by carvacrol and eugenol encapsulated in surfactant micelles. **Journal of Food Protection**, v. 68(12), p. 2559-66, 2005

DEMEU, F. A. et al. Influência da escala de produção no impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Revista Ceres**, v. 62, n. 2, p. 167–174, 2015.

DEVI, K. P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107–115, 2010.

DOLINSKY, T.J., et al. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Research** , v.32, p. 665-667, 2004.

DONSÌ, F. et al. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 4, p. 342–350, 2012.

DONSÌ, F. et al. Infusion of essential oils for food stabilization : Unraveling the role of nanoemulsion-based delivery systems on mass transfer and antimicrobial activity. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 22, p. 212–220, 2014.

ELSADEK, B.; KRATZ, F. Impact of albumin on drug delivery — New applications on the horizon ☆ , ☆☆. **Journal of Controlled Release**, v. 157, n. 1, p. 4–28, 2012.

ERSKINE, R. J. et al. ADVANCES IN THE THERAPY FOR MASTITIS. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 9, n. 3, p. 499–517, 1993.

FALEIRO M.L. The mode of antibacterial action of essential oils. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, v. 3, n. 3, p. 1143–1156, 2011.

FANG, R. et al. Study of the physicochemical properties of the BSA: Flavonoid nanoparticle. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 2, p. 275–283, 2011.

FERNANDES, J. B. C. et al. Escherichia coli from clinical mastitis : serotypes and virulence factors. 2011.

FERNANDES, J. B. C. et al. Escherichia coli from clinical mastitis : serotypes and virulence factors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23(6), p.1146-52, 2011.

FERREIRA, E, S. **Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos**. 2009. 132 f. Tese (Doutorado em Ciência) - Universidade Federal de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2009.

FERREIRA, G. A. et al. Estratégias de prevenção da mastite bovina no período de transição. **Veterinária em Foco**, v. 12, p. 80–91, 2015.

FLACH, J. et al. Biofilmes formados em materia-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33(3), p.291-296, 2005.

FLINT, S. H. et al. Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant *Streptococci*. **Journal of Food Engineering**, v.43, p.235-242, 2000.

GAO, J. et al. Molecular types and antibiotic resistance of Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis in a single herd in China. **The Veterinary Journal**, v. 192, n. 3, p. 550–552, 2012.

GARGOURI, A.; HAMED, H.; ELFEKI, A. Analysis of Raw Milk Quality at Reception and During Cold Storage : Combined Effects of Somatic Cell Counts

and Psychrotrophic Bacteria on Lipolysis. v. 78, n. 9, p. 1405–1411, 2013.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, n. 111, p. 170–174, 2006.

GOMES, F. et al. Bactericidal, opsonophagocytic and anti-adhesive effectiveness of cross-reactive antibodies against *Moraxella catarrhalis*. **FEMS Pathogens and Disease**, v. 73 (3), p. 1–19, 2016.

GRANGE, J. M.; GRANGE, J. M. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. **Tuberculosis**, v. 81, n. 12, p. 71–77, 2001.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against microbial spoilage. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 392–397, 2014.

GUAN, Y.; WU, J.; ZHONG, Q. Eugenol improves physical and chemical stabilities of nanoemulsions loaded with β -carotene. **Food Chemistry**, v. 194, p. 787–796, 2016.

GUENETTE, S. A. et al. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague–Dawley rats. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, n. 4, p. 265–270, 2006.

GUIMARÃES, F.F; LANGONI, H. Leite: alimento imprescindível, mas com riscos para a saúde pública. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, p.38-51, 2009.

GUPTA, S.; VARIYAR, P. S. **15 - Nanoencapsulation of essential oils for sustained release: application as therapeutics and antimicrobials**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016.

HAMMERA, K.A; HEEL, K.A. Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in *staphylococci* and *enterococci*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p.239– 245, 2012.

HERMANS, K. et al. *Staphylococcus*. In: GYLES C. L. et al. (Ed.) **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4 ° edição ed. Iowa: Wiley-blackwell. p. 75-89, 2010.

HE, X. M.; CARTER, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. **Nature**, v. 358, n. 6383, p. 209–215, 1992a.

HE, X. M.; CARTER, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. **Nature**, v. 358, n. 6383, p. 209–215, 1992b.

HELANDER, I.M.; ALAKOMI, H.-L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil componentes on Gram-negative bacteria.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.46, p.3590–3595, 1998.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. **Phytomedicine**, v.16(11), p.997-1005, 2009.

HILLERTON, J.E. et al. Effect of pre-milking teat dipping on clinical mastitis in dairy farms in England. **Journal of Dairy Research**, v. 60, p. 31-41, 1993.

HILLERTON, J. E.; BERRY, E. A. Treating mastitis in the cow – a tradition or an archaism. p. 1250–1255, 2005.

HOGAN, J.; SMITH, K.L. Coliform mastitis. **Veterinary Research**. v. 34, p.507-519, 2003.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano - Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutic al Research**, v. 12, n. 2, p. 265–273, 2013.

HUANG, T.S. et al. Decontamination efficacy of combined chlorine dioxide with ultrasonication on apples and lettuce. **Journal of Food Science**, v.71, n. 4, p. 134-139, 2006.

HUMPHREY, W. et al. "VMD - Visual Molecular Dynamics", **Journal of Molecular Graphics**, vol. 14, p. 33-38, 1996.

INDYK, H. E.; GILL, B. D.; WOOLLARD, D. C. An optical biosensor-based immunoassay for the determination of bovine serum albumin in milk and milk products. **International Dairy Journal**, v. 47, p. 72–78, 2015.

IRWIN, et al., ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology, **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52 (7), p 1757–1768, 2012

ISO/TC 54- Draft Report of the 25rd plenary meeting of ISO/TC 54 "Essential Oils" 2006. Document ISO/TC 54 - N 2405.

JATTINAGOUDAR, L. et al. Evaluation of the binding interaction between bovine serum albumin and dimethyl fumarate, an anti-inflammatory drug by multispectroscopic methods. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 156, p. 164–171, 2016.

JORDAN, et al. Augmentation of killing of *Escherichia coli* O157 by combinations of lactate, ethanol, and low-pH conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p.1308-1311, 1999.

JUVEN, B.J. et al., Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Microbiology**, v.76, p.626– 631, 1994.

KAUR, I. P. et al. Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. **Journal of Controlled Release**, v. 127, n. 2, p. 97–109, 2008.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n.2, p. 123-40, 2004.

KAUR, I. P. et al. Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. **Journal of Controlled Release**, v. 127, n. 2, p. 97–109, 2008.

KEEFE, G. Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for Management of Mastitis. **VFP**, v. 28, n. 2, p. 203–216, 2012.

KELL, DB. et al. Quantifying heterogeneity: flow cytometry of bacterial cultures. **Antoine van Leeuwenhoek**, v. 60, p.145-158, 1991.

KEMPF, F.; LOUX, V. Genome Sequences of Two Bovine Mastitis-Causing *Escherichia coli* Strains. **Genome Announc**, v. 3, n. 2, p. 3545, 2015.

KLAN, A.; JER, B.; SMOLE, S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, p. 121–126, 2010.

KLANG, V. et al. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. **Micron**, v. 43, n. 2–3, p. 85–103, 2012.

KONG, X., LIU, X., LI, J., YANG, Y. Advances in Pharmacological Research of Eugenol. **Curr Opin Complement Alternat Med**, v.1, p.2-11, 2014.

KRATZ, F. Albumin as a drug carrier : Design of prodrugs , drug conjugates and nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 132, n. 3, p. 171–183, 2008.
KULKARNI, A. G.; KALIWAL, B. B. REVIEW ARTICLE BOVINE MASTITIS : A REVIEW. v. 4, p. 543–548, 2013.

KULKARNI A.G; KALIWAL B. Bovine mastitis: a review. **International Journal of Recent Scientific Research**. v. 4, p. 543-548, 2013.

KUN, R. et al. Isothermal titration calorimetric studies of the pH induced conformational changes of bovine serum albumin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 96, n. 3, p. 1009–1017, 2009.

LANGONI, H. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v.3, p.57-64, 2000.

LAMBERT, R.J.W. et al., A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.453–462, 2001.

LAMEIRASA, F. S. et al. Measurement of the Zeta Potential of Planar Surfaces With a Rotating Disk. **Materials Research**, v. 11, n. 2, p. 217–219, 2008

LASIC, D. D. et al. Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. **BBA - Biomembranes**, v. 1070, n. 1, p. 187–192, 1991.

LEHTOLAINEN, T. *Escherichia coli* mastitis Bacterial factors and host response. Dissertação (**Mestrado in Animal Production**) - University of Helsinki, Finland, 2004.

LI, R. et al. Role of pH-induced structural change in protein aggregation in foam fractionation of bovine serum albumin. **Biotechnology Reports**, v. 9, p. 46–52, 2016.

LIU, H.; DU, Y.; WANG, X.; SUN, L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, p. 147–155, 2004.

LV, F. et al. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **FRIN**, v. 44, n. 9, p. 3057–3064, 2011.

MACHADO, P.F. et al. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.1883-1886, 2000.

MAIA, P.V. **Vacinação com *Escherichia coli* j5 no período pré-parto e ocorrência de mastite, produção de leite e desempenho reprodutivo de vacas mestiças leiteiras.** 2011. 52p. Mestrado (Dissertação em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte- MG, 2011.

MANIKANDAN, P. et al. Eugenol induces apoptosis and inhibits invasion and angiogenesis in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. **Life Sciences**, v. 86, n. 25–26, p. 936–941, 2010.

MARIER, J. F. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague – Dawley rats. p. 265–270, 2006.

MAZA, P. K. et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. v. 55, p. 99–105, 2006.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285–330, 2011.

MEI, H. C. et al. Cell surface hydrophobicity is conveyed by S-layer proteins: a study in recombinant lactobacilli. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 28, n. 2/3, p. 127-134, 2003.

MENDES, G. C. et al. Análises físico-químicas e pesquisa de fraude no leite informal comercializado no município de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, p.349-356, 2010

MICHNIK, A.; MICHALIK, K.; DRZAZGA, Z. STABILITY OF BOVINE SERUM ALBUMIN AT DIFFERENT pH. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 80, p. 399–406, 2005.

MONTANARI, R. M. et al. Exposure to Anacardiaceae Volatile Oils and Their Constituents Induces Lipid Peroxidation within Food-Borne Bacteria Cells. **Molecules**, v.17(8), p. 9728-40, 2012.

MOON, J. et al. Phenotypic and Genetic Antibigram of Methicillin-Resistant *Staphylococci* Isolated from Bovine Mastitis in Korea Phenotypic and Genetic Antibigram of Methicillin-Resistant. n. APRIL 2007, 2016.

MOREIRA, M. B. et al. Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Química Nova**, v. XY, p. 1–6, 2014.

NAFISI, S.; SADEGHI, G. B.; PANAHYAB, A. Interaction of aspirin and vitamin C with bovine serum albumin. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 105, n. 3, p. 198–202, 2017.

NAIK, P. N.; CHIMATADAR, S. A.; NANDIBEWOR, S. T. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy Study on the interaction between antibacterial drug and bovine serum albumin: **A spectroscopic approach**. v. 73, p. 841–845, 2009.

NICKERSON, S. C.; OLIVER, S. P. R States: How well have United dairy producers adopted mastitis-control technologies for reducing herd somatic cell counts and improving milk quality ? **The Professional Animal Scientist**, v. 30, n. 2, p. 115–124, 2014.

NUNES, N.M. **Termodinâmica de interação entre ácido cinâmico e cinamato de metila e albumina do soro bovino**. 2016. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.

NUTCHA, B. et al. PAPER PRESENTED AT IAPRI SYMPOSIUM 2011 , BERLIN Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde and Eugenol and Their Activity after Incorporation into Cellulose - based Packaging Films. **Packaging and Materials Technology**, v. 25 , p. 7–17, 2012.

O'DONNELL, E. A. et al. Multiparameter flow cytometry: advances in high resolution analysis. **Immune Network Research**, v. 13, n. 2, p. 43- 54, 2013.

OGAN, J. H.; MITH, K. L. S. Review article Coliform mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, p. 507–519, 2003.

OLIVEIRA, C.M.C. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.2, p.104- 110. 2011

OLIVEIRA, W. P. et al. Impacto da Contagem de Células Somáticas Elevada no Rendimento de Queijo mussarela, **In: II Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**, Anais do II CBQL, 2006.

OLIVER, S. P. et al. Efficacy of Extended Ceftiofur Intramammary Therapy for Treatment of Subclinical Mastitis in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 8, p. 2393–2400, 2004.

OYEDEMI, S. O. et al. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 7, p. 1280–1286, 2009.

OZTURK, K. et al. The influence of technological parameters on the physicochemical properties of blank PLGA nanoparticles. **Pharmazie**, v. 65, n. 9, p. 665–669, 2010.

PACKIAVATHY I. A. S. V. et al.,. Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of Cuminum cyminum and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. **Food Research International**, v.45, p.85–92, 2012.

PAIXÃO, M.G. et al. Impacto econômico da implantação das boas práticas agropecuárias relacionadas com a qualidade do leite. **Revista Ceres**, v. 61, n.5, p. 612-621, 2014.

PARISH, M.E.et al. Methods to reduce/eliminate pathogens form fresh and fresh-cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2 (supplement), 2003.

PATIL, S. et al. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. **Biomaterials**, v. 28, n. 31, p. 4600–4607, 2007.

PERES, N. F; ZAPPA V. Mastite em vacas leiteiras - revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.16, p.1-28, 2011

PETON, V. et al. Fine-tuned characterization of Staphylococcus aureus Newbould 305 , a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines. **Veterinary Research** p. 1–15, 2014.

PICCOLI, N. N. B. N. G. C. M. M. DE O. R. aço inoxidável em contato com leite e seu controle por óleos essenciais Biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa on stainless steel in contact with milk and its control by essential oils. v. 25, n. 1, p. 19–24, 2014.

PIRES, A. C. S.; SILVA, M. C. H.; SILVA, L. H. M. **Physical Chemistry of Colloidal Systems Applied to Food Engineering**. In: COIMBRA, J. S. R.; TEIXEIRA, J. A. Engineering aspects of milk and dairy products, Boca Raton: CRC press, 2009, p.1-25.

PISIAT, P.; NIKAIDO, H. Outer membranes of Gram-negative bacteria are permeable to steroid probes. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 1323–1333, 1992.

PLOUX, L. Quantitative and morphological analysis of biofilm formation on self-assembled monolayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 57, n. 2, p.174-181, 2007.

PRESTES, D. S. et al. Suscetibilidade à mastite: Fatores que a influenciam- Uma revisão. **Revista Faculdade Zootecnia Veterinária e Agronomia**, v. 9, n. 1, p. 48-59, 2003.

PYORALA, S. In vitro Studies as Supporting Evidence on the Efficacy of Antimicrobials for Mastitis Treatment. **Journal Applied Microbiology**, v. 107, n. 6, p. 2116-2117, 2009.

RADHA KRISHNAN, K. et al. Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 171, p. 32–40, 2013.

RADOSTITS, O.M. et al. Clínica Veterinária – Um tratado de doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos, Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 541-62, 2007.

RAYBAUDI-MASSILA, R.M. et al. Use of malic acid and other quality stabilizing compounds to assure the safety of fresh-cut ‘Fuji’ apples by inactivation of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia coli* 0157:H7. **Journal of Food Safety**, v.29, n.1, p.236-252, 2009.

RIBEIRO, M.G. et al. Fator necrosante citotóxico em *Escherichia coli* isolada de mastite clínica bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, p.648-650, 2002.

ROLAND, I. et al. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, n. 1–2, p. 85–94, 2003.

ROMA, J. L.C. et al. Sazonalidade do teor de proteína e outros componentes do leite e sua relação com programa de pagamento por qualidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61. p.1411-1418, 2009.

ROTA, C.; HERRERA, A.; MARTI, R. M. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food control**, v. 19, p. 681–687, 2008.

ROY, A. S. et al. A spectroscopic study of the interaction of the antioxidant naringin with bovine serum albumin. *Journal of Biophysical Chemistry*, v. 1, n. 3, p. 141–152, 2010.

ROYSTER, E.; WAGNER, S. Treatment of Mastitis in Cattle. **Veterinary Clinics of NA: Food Animal Practice**, v. 31, n. 1, p. 17–46, 2015

SÁ, J.P.N. **Influência genotípica de estirpes de *Bacillus cereus* na adesão bacteriana e na resistência a sanitizantes químicos**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2013.

SAJJAD, M.; KHAN, A.; AHMAD, I. Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 618–621, 2012

SCHÄELLIBAUM, M. Efeitos de altas contagens de células somáticas sobre a produção e qualidade de queijos. In: **Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite**. Anais Curitiba: CIETEP/FIEP, p.21-26., 2000.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SETZER, W.N. et al. Antimicrobial activity of *Artemisia douglasiana* leaf essential oil. **Fitoterapia**, v.75, p.192-200, 2004.

SHAH, B.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. International Journal of Food Microbiology Nanodispersed eugenol has improved antimicrobial activity against *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in bovine milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, n. 1, p. 53–59, 2013.

SHAH, R. et al. Optimisation and Stability Assessment of Solid Lipid Nanoparticles using Particle Size and Zeta Potential. **Journal of Physical Science**, v. 25, n. 1, p. 59–75, 2014.

SHAHEEN, M.; TANTARY, H.; NABI, S. A Treatise on Bovine Mastitis: Disease and Disease Economics, Etiological Basis, Risk Factors, Impact on Human Health, Therapeutic Management, Prevention and Control Strategy. **Journal Advances in Dairy Research**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2016.

SHUSTER, D.E. et al. Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p.3763-74, 1991.

SHI, X.; ZHU X. Biofilm formation and food safety in food industries Trends in **Food Science and Technology**, v. 20, n. 9, p.407-413, 2009.

SILVA, C.E.L. **Termodinâmica de interação entre betacaroteno e proteínas do leite**. 2015. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2015.

SILVA, D.M. **Isolamento, caracterização e genômica comparativa de patógenos de mastite bovina**. 2016. 89p. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.

SILVESTRI, J. D. F. et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, n. 5, p. 589-594, 2010.

SOKMEN A, et al. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. **Food Control**, v.15(8), p. 627-634, 2004.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101–106, 2012.

TAUXE, R.V. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. **Emerging Infectious Diseases journal**, v.3, p.1-13, 1997.

TAYEH, N.; RUNGASSAMY, T.; ALBANI, J. R. Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Journal of Pharmaceutical and Biomedical**, v. 50, p. 107–116, 2009.

TAYLOR, P. et al. Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents Plant Essential Oils as Active. n. November 2013, p. 37–41, 2014.

TECHNOLOGY, P. Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde and Eugenol and Their Activity after Incorporation into Cellulose-based ... Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde and Eugenol and Their. n. January, 2012.

TRAGOOLPUA, Y.; JATISATIENR, A. Anti-herpes simplex virus activities of *Eugenia caryophyllus* (Spreng.). Bullock & S. G. Harrison and essential oil, eugenol. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 1153–1158, 2007.

TROTT, A. J. et al. Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v.31, p.455-461, 2010.

UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, n. 2, p. 99–105, 2011.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; SMID, E.J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65 (10), p.4606– 4610, 1999.

VENTUROSIO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

VIGUIER, C., ARORA, S., GILMARTIN, N., WELBECK K., O'KENNEDY, R. Mastitis Detection: current trends and future perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 27 n .8, p. 486-493, 2009.

VILLANOVA, J. C. O.; OREFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. Polímeros: **Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

WANG, N. et al. Journal of Colloid and Interface Science Influence of metal oxide nanoparticles concentration on their zeta potential. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 407, p. 22–28, 2013.

WEISS, J. et al. Nanostructured Encapsulation Systems: Food Antimicrobials. chapter 24, **Global Issues in Food Science and Technology**, 2009.

WHELEHAN, C. J. et al. Veterinary Immunology and Immunopathology Experimental Staphylococcus aureus infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 140, n. 3–4, p. 181–189, 2011.

YADAV, R. et al. Encapsulation of catechin and epicatechin on BSA NPs improved their stability and antioxidant potential. **EXCLI Journal**, v. 13, p. 331–346, 2014.

YEGIN, Y. et al. Development and characterization of geraniol-loaded polymeric nanoparticles with antimicrobial activity against foodborne bacterial pathogens. **Journal of Food Engineering**, v. 170, p. 64–71, 2015.

ZADOKS R.N. et al. Mastitis-causing *Streptococci* are importante contributors to bacterial counts in raw bulk tank milk. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2644-2650, 2004.

ZAFALON, L.F. et al. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação, **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.59, n.3, p.577-585, 2007.

ZHAO, D. et al. delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, p. 669–677, 2010.

ZHENG, L. et al. Antimicrobial activity of natural antimicrobial substances against spoilage bacteria isolated from fresh produce. **Food Control**, v. 32, n. 2, p. 665–672, 2013.

ZHOU L.; ZHENG H.; TANG Y.; YU W.; GONG Q. Eugenol inhibits quórum sensing at sub-inhibitory concentrations. **Biotechnol Lett.**, v.35(4), p.631-7, 2013.

ZORZI, G. K. et al. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 4, p. 426–436, 2015.