

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

KARINE CAPPuccio DE CASTRO

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA/PLA PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE ANTIBIÓTICO NO TRATAMENTO DE MASTITE**

Poços de Caldas/MG

2017

KARINE CAPPUCCIO DE CASTRO

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA/PLA PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE ANTIBIÓTICO NO TRATAMENTO DE MASTITE**

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), *campus* Poços de Caldas, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia de Materiais. Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.
Orientadora: Dra. Maria Gabriela Nogueira Campos.

Poços de Caldas/MG

2017

C355s Castro, Karine Cappuccio de.
Síntese de nanopartículas de quitosana/PLA para liberação controlada de antibiótico no tratamento de mastite / Karine Cappuccio de Castro. – Poços de Caldas, 2017.
63 f. –

Orientadora: Maria Gabriela Nogueira Campos.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2017.
Bibliografia.

1. Nanopartículas. 2. Quitosana. 3. Poli (Ácido Láctico). 4. Gentamicina. 5. Mastite. I. Campos, Maria Gabriela Nogueira. II. Título.

CDD: 620.11

KARINE CAPPUCCIO DE CASTRO

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA/PLA PARA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE ANTIBIÓTICO NO TRATAMENTO DE MASTITE**

A banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia de Materiais, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Alfenas.

Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Aprovada em: 27 de julho de 2017.


Profa. Dra. Maria Gabriela Nogueira Campos

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG


Profa. Dra. Flávia Chiva Carvalho

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG


Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques

Instituição: Universidade Estadual Paulista - UNESP

*A minha mãe, pelo
exemplo de luta,
persistência e por ser
meu porto seguro
sempre.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e mais importante gostaria de agradecer a Deus por ter me concedido toda sabedoria e discernimento para chegar até aqui.

Agradeço aos meus pais pelo apoio incondicional em todas as minhas escolhas.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Gabriela Nogueira Campos não existem palavras que expressem minha eterna gratidão. Agradeço não só pela orientação na vida acadêmica, mas pela amizade concedida durante todos esses anos, pelos conselhos, pelas conversas e por todo o ensinamento compartilhado. Sua serenidade e paciência em todas as nossas conversas sempre me tranquilizavam mesmo quando eu pensava que tudo estava perdido. Saiba que tem muito de você na profissional que tenho me tornado, e que minha admiração por você como profissional e pessoa só aumentam com o passar dos anos. A você deixo o meu muito obrigado e minha eterna amizade, que você inspire muitas pessoas por onde passar, assim como você me inspirou a seguir o caminho que sigo hoje.

Aos meus amigos agradeço pelo apoio de todos os dias, sem vocês não teria conseguido chegar a lugar algum.

Ao meu irmão, Diego, pelo amor e companheirismo de sempre.

Aos professores do PPGCEM pelo conhecimento transmitido e pela disponibilidade em ajudar sempre que possível.

À Mayara da Mota Matos, secretária do PPGCEM por sempre estar à disposição.

À professora Dra. Flávia Chiva Carvalho pelo auxílio nas análises de DLS e Potencial Zeta.

Ao professor Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques por todo auxílio prestado tanto na síntese quanto nas análises.

Ao doutorando Rodolfo Debone Piazza por toda paciência e auxílio prestado no processo de síntese.

Ao professor Dr. Jorge Kleber Chavasco e a Dra. Maria do Socorro Fernandes Melo pelo auxílio nos ensaios microbiológicos.

À Dra. Lucíola Lucena de Sousa pela disponibilidade e amizade.

À Universidade Federal de Alfenas por toda estrutura oferecida para que o trabalho fosse realizado.

A CAPES pela bolsa concedida.

Por fim agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho e torceram por mim nessa caminhada.

RESUMO

A mastite bovina ocasiona grave impacto no setor leiteiro, causando sérios prejuízos, tanto pelo comprometimento funcional da glândula mamária, como na redução da produção de leite. Além disso, causa sérios riscos à saúde pública, uma vez que as principais espécies de patógenos bacterianos causadores de mastite são produtoras de toxinas. Neste contexto, a nanotecnologia é uma alternativa bastante interessante para contornar as limitações dos tratamentos convencionais de mastite, através da criação de dispositivos nanoestruturados que sejam capazes de direcionar o antimicrobiano para a superfície do epitélio glandular e para o interior do tecido afetado, de forma a potencializar o efeito do antibiótico sob as bactérias. O uso da quitosana e do Ácido Polilático (PLA) para este tipo de aplicação se deve às suas inúmeras propriedades, em especial a biocompatibilidade e a biodegradabilidade. Desta forma, este trabalho teve como objetivo a obtenção e caracterização de diferentes formulações de nanopartículas de quitosana/PLA para liberação controlada de gentamicina (GEN), através da metodologia de emulsificação - evaporação de solvente. As nanopartículas foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplada a um Detector de Energia Dispersiva (EDS), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Distribuição do Tamanho de Partículas (DLS) e Carga Superficial (Potencial Zeta). Ainda, foram avaliadas a eficiência de encapsulamento da gentamicina, a liberação de gentamicina *in vitro* pelo método de diálise e a atividade antimicrobiana através do teste de Difusão em Disco e da determinação da Concentração Mínima de Inibição (CMI) pelo método de microdiluição sucessiva, utilizando *Staphylococcus aureus*. As análises de DLS mostraram um tamanho médio de nanopartículas entre 150 e 400 nm, variando com a composição da formulação. As análises de MEV mostraram partículas esféricas de tamanho correspondente às medidas de DLS, por essa análise também foi possível observar a formação de aglomerados em determinadas condições de síntese. Pelas análises de FTIR, através das bandas características e do alargamento e/ou aumento da intensificação das bandas, foi possível confirmar a interação entre os componentes da formulação, sugerindo a formação de uma nanopartícula do tipo “*core-shell*”, onde o PLA estaria no núcleo e a quitosana na casca. Ainda, o estudo do potencial zeta em função do pH mostrou que as partículas possuem cargas de superfície positivas, provavelmente devido à presença de quitosana na casca, o que é atrativo para adesão celular. A eficiência de encapsulamento variou de 66 a 75%. A formulação 1:0,25 (w/w, PLA/quitosana) foi a que apresentou maior eficiência de encapsulamento, sugerindo que o PLA, apesar de hidrofóbico, influenciou na retenção da gentamicina (hidrofílica) na nanopartícula. A análise por EDS confirmou a presença de enxofre em todas as formulações contendo sulfato de gentamicina, o que também comprovou o encapsulamento do antibiótico. Os ensaios de liberação mostraram que a maior concentração de gentamicina foi liberada nas 6 primeiras horas de ensaio. Além disso, após 96 horas de ensaio, cerca de 90% da concentração inicial da gentamicina foi liberada. Por fim, o ensaio antimicrobiano realizado com as suspensões utilizadas o ensaio de liberação *in vitro* indicou a inibição do crescimento da *Staphylococcus aureus*, principal causadora da mastite bovina, bem como a CMI obtida para todas as amostras foi condizente com a literatura.

Palavras-chave: Nanopartículas. Quitosana. Poli(Ácido Lático). Liberação de Gentamicina. Mastite.

ABSTRACT

Bovine mastitis causes a serious impact on the dairy sector, causing serious damage, both due to the functional impairment of the mammary gland, with reduced milk production. In addition, it causes serious risks to public health, as the major species of bacterial pathogens that cause mastitis are produce toxin. In this context, nanotechnology is a very interesting alternative to overcome the limitations of conventional mastitis treatments, through the creation of nanostructured devices that are able to direct the antimicrobial to the surface of the glandular epithelium and into the affected tissue in order to potentiate the effect of the antibiotic under bacteria. The use of chitosan and Polylactic Acid (PLA) for this type of application is due to its numerous properties, especially biocompatibility and biodegradability. Thus this work was aimed at obtaining and characterization of nanoparticles for controlled release of gentamicin (GEN) through the emulsification - solvent evaporation. The nanoparticles were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) coupled to a Dispersive Energy Detector (EDS), Infrared Spectroscopy with Fourier Transform (FTIR), Dynamic Light Scattering (DLS) and Zeta Potential measurements. In addition, the efficiency of encapsulation of gentamicin, the *in vitro* release of gentamicin using the dialysis method and the antimicrobial activity through the disc diffusion test and the determination of the Minimum Inhibition Concentration (MIC) by the successive microdilution method, using *Staphylococcus aureus*, were evaluated. DLS analyses showed an average nanoparticle size between 150 and 400 nm, varying with the composition of the formulation. The SEM analyzes correlated well with the DLS measurements, by this analysis it was also possible to observe the formation of agglomerates under certain conditions of synthesis. By FTIR analysis through the characteristic bands and the enlargement and/or increase of the bands intensification, confirmed the interaction between the components of the formulation, suggesting the formation of a core-shell nanoparticle, where the PLA would be in the nucleus and the chitosan in the shell. The study of zeta potential as a function of pH showed that the particles have positive surface charges, which is attractive for cell adhesion. The encapsulation efficiency varied from 66 to 75%, the 1:0.25 sample was the most successful in the encapsulation, suggesting that gentamicin, although hydrophilic, was also bound to PLA (hydrophobic). ESD analysis confirmed the presence of sulfur in all formulations containing gentamicin sulfate, which also confirmed the encapsulation of the antibiotic. The release assays showed that the highest concentration of gentamicin was released in the first 6 hours and that in the period from 24 to 96 hours that concentration remained in equilibrium. Finally, the antimicrobial assay is performed with the suspensions used *in vitro* release test showed the growth inhibition of *Staphylococcus aureus* main cause of bovine mastitis, and the MIC obtained for all samples was consistent with the literature.

Keywords: Nanoparticles. Chitosan. Poly (Lactic Acid). Gentamicin Release. Bovine Mastitis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Comparação entre o tratamento convencional e o uso da nanotecnologia.....	18
Figura 2 – Representação esquemática de nanopartículas poliméricas de acordo com a organização estrutural.	19
Figura 3 – Estrutura molecular da quitosana.	20
Figura 4 – Síntese de PLA de alto peso molecular.....	22
Figura 5 – Estrutura química do sulfato de gentamicina.	24
Figura 6 – Procedimento experimental no preparo das nanopartículas.....	28
Figura 7 – Gráficos de DLS após a filtração: (a) Nanopartículas (b) Nanopartículas carregadas. Comparativo entre nanopartículas e nanopartículas carregadas: (c) 1:0,25 (d) 1:0,50 (e) 1:0,75.	35
Figura 8 – Gráficos de DLS após a liofilização: (a) Nanopartículas (b) Nanopartículas carregadas. Comparativo entre nanopartículas e nanopartículas carregadas: (c) 1:0,25 (d) 1:0,50 (e) 1:0,75.	37
Figura 9 – Gráficos de DLS após a liofilização: (a) Nanopartículas (b) Nanopartículas carregadas. Comparativo entre nanopartículas e nanopartículas carregadas: (c) 1:0,25 (d) 1:0,50 (e) 1:0,75.	40
Figura 10 – Espectros de FTIR (% de Transmitância): (a) Nanopartículas e componentes de síntese (b) Nanopartículas carregadas e gentamicina. Comparativo entre nanopartículas e nanopartículas carregadas: (c) 1:0,25 (d) 1:0,50 (e) 1:0,75.	42
Figura 11 – MEV das nanopartículas após a filtração (a) 1:0,25 (b) 1:0,25 + GEN (c) 1:0,50 (d) 1:0,50 + GEN (e) 1:0,75 (f) 1:0,75 + GEN.	43
Figura 12 – MEV das nanopartículas ressuspensas após a liofilização (a) 1:0,25 (b) 1:0,25 + GEN (c) 1:0,50 (d) 1:0,50 + GEN (e) 1:0,75 (f) 1:0,75 + GEN.....	45
Figura 13 – Perfil de liberação das nanopartículas carregadas com gentamicina no período de 96 horas (a) 1:0,25 (b) 1:0,50 (c) 1:0,75.	48
Figura 14 – Resultado da atividade antimicrobiana das nanopartículas nas placas com <i>Staphylococcus aureus</i> . I – Amostras carregadas com gentamicina: (a) 1:0,75 (b) 1:0,50 (c) 1:0,25 (d) Controle Positivo (e) Controle Negativo. II – Amostras sem gentamicina: (a) 1:0,75 (b) 1:0,50 (c) 1:0,25 (d) Controle Positivo (e) Controle Negativo.	51
Figura 15 – Placa de 96 poços utilizada no experimento de microdiluição após adição de resazurina para a determinação da concentração mínima inibitória das nanopartículas carregadas com gentamicina sobre as cepas <i>S. aureus</i>	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- BHI** – Brain Heart Infusion
- CCS** – Contagem de Células Somáticas
- CMI** – Concentração Mínima de Inibição
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- EDS** – Detector de Energia Dispersiva
- FTIR** – Infravermelho com transformada de Fourier
- GEN** – Gentamicina
- MEV** – Microscopia Eletrônica de Varredura
- MH** – Mueller-Hinton
- PDI** – Polidispersividade
- PGA** – Poli (Ácido glicólico)
- PLA** – Poli (Ácido láctico)
- PLGA** – Poli (Ácido láctico-co-glicólico)
- PMN** – Polimorfonucleares
- QUI** – Quitosana
- RNA** – Ácido Ribonucleico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tamanho Médio de Partícula e Polidispersividade (PDI) das partículas em suspensão.....	34
Tabela 2 – Tamanho Médio de Partícula e Polidispersividade (PDI) das partículas em redispersas após a liofilização.....	37
Tabela 3 – Medidas de Potencial Zeta após a filtração.....	38
Tabela 4 – Medidas de Potencial Zeta após a liofilização.....	38
Tabela 5 – Eficiência de encapsulamento da gentamicina.....	46
Tabela 6 – Percentual mássico de enxofre obtido por EDS.....	47
Tabela 7 – Gentamicina liberada após 96 horas.....	50
Tabela 8 – Concentrações de gentamicina presente nas nanopartículas carregadas em cada uma das formulações.....	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	MASTITE E O CENÁRIO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE LEITE.....	15
2.2	NANOPARTÍCULAS E O TRATAMENTO DE MASTITE.....	16
2.3	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	18
2.4	QUITOSANA	19
2.5	ÁCIDO POLILÁTICO	21
2.6	LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACO	23
2.6.1	Gentamicina	23
2.7	MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLÍMICAS	24
2.8	MÉTODO DE SÍNTESE E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	MATERIAIS.....	27
3.2	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	27
3.2.1	Preparo das Nanopartículas	27
3.2.2	Tamanho Médio das Nanopartículas	29
3.2.3	Potencial Zeta	29
3.2.4	Estabilidade Coloidal em função do pH	29
3.2.5	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	30
3.2.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	30
3.2.7	Obtenção da curva padrão	30
3.2.8	Eficiência do Encapsulamento do Fármaco	31
3.2.9	Liberação de gentamicina <i>in vitro</i>	31
3.2.10	Ensaio Microbiológico	32
3.2.11	Concentração Mínima de Inibição	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
4.1	TAMANHO MÉDIO DAS PARTÍCULAS	34
4.2	POTENCIAL ZETA	38
4.3	ESTABILIDADE COLOIDAL EM FUNÇÃO DO pH.....	39
4.4	FTIR.....	41
4.5	MEV.....	43
4.6	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO	46

4.6.1	Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS)	46
4.7	LIBERAÇÃO CONTROLADA DE GENTAMICINA <i>IN VITRO</i>	47
4.7.1	Avaliação do Processo de Liberação	49
4.8	ENSAIO MICROBIOLÓGICO.....	50
4.9	CONCENTRAÇÃO MÍNIMA DE INIBIÇÃO.....	52
5	CONCLUSÕES	55
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma inflamação da glândula mamária, caracterizada por alterações patológicas no tecido glandular, com consequentes alterações físico-químicas no leite (FAN et al., 2016; MARQUES et al., 2016), sendo atualmente uma das principais patologias que atinge os rebanhos bovinos no mundo, levando a enormes perdas econômicas em fazendas e indústrias leiteiras (GRUET et al., 2001; RASPANTI et al., 2016).

As diferentes respostas apresentadas pelo organismo do animal durante a infecção da glândula mamária causada pelos mais de 150 tipos diferentes de patógenos causadores de mastite ainda são mal compreendidas (YUNHE et al., 2013). Porém, na maioria dos casos uma infecção por bactérias gram-negativas, como *Escherichia coli*, pode muitas vezes causar a mastite clínica, que é caracterizada como uma infecção aguda e severa, que pode ser eliminada em poucos dias (VANGROENWEGHE; LAMOTE; BURVENICH, 2005; YUNHE et al., 2013). Em contrapartida, uma infecção com bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, muitas vezes causa uma mastite crônica e persistente, conhecida como mastite subclínica (TAPONEN; PYORALA, 2009; YUNHE et al., 2013).

O tratamento convencional atual pode ser administrado por via sistêmica ou intramamária exige altos cuidados e pode causar falhas no controle da infecção ou atraso na cicatrização, uma vez que a dosagem é imprecisa e administrada de forma descontínua, o que gera grandes quantidades residuais do antibiótico no organismo do animal.

A quantidade de antimicrobianos normalmente utilizada para o tratamento convencional de infecções é mais elevada que a dose necessária para inativar os organismos patogênicos, o que favorece a produção de efeitos citotóxicos. Para uma terapia antimicrobiana de sucesso, a dose deve ser a mínima necessária, a fim de evitar os efeitos secundários já relatados em literatura oriundos de citotoxicidade direta ou hipersensibilidade alérgica como nefrite intersticial (SAHA et al. 2007).

Os antimicrobianos das formulações tradicionais apresentam pouca chance de penetração em altas concentrações nas células de defesa, o que dificulta a eliminação de focos de infecção intracelular e favorece recidivas pós-tratamentos (BEMBEKE et al. 2006), e é por isso que novas alternativas têm sido estudadas para melhorar o bem-estar animal e obter maior eficiência no combate da infecção. Diante desse contexto, a utilização de vetores nanoestruturados de fármacos surge como uma possível forma de tratamento desta doença (CASTANHEIRA, 2012).

A diferença entre o tratamento convencional e a utilização de nanoestruturas está basicamente em como o medicamento é carregado no organismo. Em tese, nada muda em relação ao antibiótico, mas no seu transporte até as células. O antibiótico é encapsulado em uma nanopartícula menor do que a célula, o que possibilita sua atuação tanto extra como intracelular.

Nos últimos anos, nanopartículas poliméricas de origem natural e/ou sintética tem sido amplamente investigadas para liberação controlada de fármaco (HU et al., 2002). Alguns polímeros têm despertado maior interesse devido ao seu potencial de aplicabilidade, como é o caso da quitosana (QUI), um polímero natural com propriedades importantes para o transporte de medicamentos, como biocompatibilidade e biodegradabilidade. Além disso, a quitosana apresenta características catiônicas que é responsável pela sua afinidade por membranas biológicas e por sua capacidade antimicrobiana (YUAN et al., 2008).

O Ácido Polilático (PLA) é uma das classes de polímeros alifáticos mais amplamente utilizadas no transporte de fármacos, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e excelentes propriedades mecânicas e térmicas (DEV et al., 2010; WANG et al., 2015).

Levando em consideração as características apresentadas anteriormente, é promissor combinar as funções bioativas da quitosana com as boas propriedades mecânicas do PLA para gerar um composto biohíbrido anfifílico (JEEVITHA; AMARNATH, 2013). Os grupamentos reativos da quitosana, amina e hidroxila, oferecem possibilidades de modificações através da reação do enxerto e interações iônicas (WANG et al., 2015). Nessas condições, essa combinação pode ser realizada pela interação iônica entre as cargas positivas da quitosana e as cargas negativas do PLA. Uma liberação lenta e contínua do fármaco se torna interessante para que se evitem infecções, e é nesse contexto que o PLA se torna um atrativo no processo de síntese de nanopartículas para este fim, tendo em vista que ele se degrada lentamente e sua degradação pode ser controlada em função do pH (DEV et al., 2010; WANG et al., 2015).

Para que todo processo alcance o sucesso desejado, as nanopartículas devem ser preparadas com base em uma razão princípio ativo/polímero adequada à obtenção de uma elevada eficiência de encapsulamento e uma baixa toxicidade (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

Existem diversos métodos para o preparo de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados. Neste trabalho foi utilizado o método de emulsificação-evaporação de solvente, por ter como características alto controle, alto rendimento e facilidade no processo de síntese (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

A escolha do princípio ativo também é um parâmetro importante tanto na determinação do método de síntese, quanto do ponto de vista da saúde do animal e da produtividade da glândula mamária (BRITO et al., 2001; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). A gentamicina é atualmente o principal antibiótico utilizado no tratamento convencional da mastite bovina, e sua escolha para incorporação as nanopartículas se deve ao seu amplo espectro e ao baixo custo (FREITAS et al., 2005).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi sintetizar e caracterizar nanopartículas poliméricas (QUI/PLA) pelo método de Emulsificação-Evaporação do Solvente para potencial aplicação no tratamento de mastite bovina na liberação controlada de antibiótico; além do estudo da atividade antimicrobiana da gentamicina, utilizando a bactéria *Staphylococcus aureus*, que é a principal bactéria causadora de mastite em rebanhos bovinos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seguir foram descritas informações relevantes consolidadas na literatura, sobre sistemas poliméricos nanoestruturados, liberação controlada de antibiótico, problemas envolvendo a mastite bovina e formas de tratamento da patologia.

2.1 MASTITE E O CENÁRIO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE LEITE

O Brasil é um dos países mais competitivos no setor pecuário leiteiro mundial. Essa competitividade é gerada pelo fato do país possuir baixos custos de produção. Isso se deve às condições climáticas favoráveis, mão de obra relativamente barata e produtividade favorável tanto pela genética, quanto pela alimentação do animal, além de possuir 90 milhões de hectares de fronteira para expansão agrícola (ALVES; GODOI; BUENO, 2010).

Segundo dados da Embrapa em 2010, a produção mundial de leite foi de 695,7 bilhões de litros, dos quais o Brasil contribuiu com 30,7 bilhões de litros (VILELA, 2011). Atualmente, os dados divulgados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture - USDA) e pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil ocupou a quinta posição no ranking mundial de produção de leite em 2014 e em 2015 subiu para quarta colocação, como uma produção de 34 bilhões de litro (IBGE, 2015).

Para que a produção de leite tenha representatividade no cenário mundial, é necessário que se obtenha níveis de qualidade extremamente elevados, implicando em rebanhos tratados de forma correta, além de se prevenir ou tratar qualquer tipo de doença que se manifeste no animal. Para se verificar os padrões de qualidade do leite pode-se caracterizá-lo microbiologicamente, pois desta forma é possível obter um bom indicativo da saúde da glândula mamária do rebanho e das condições gerais de manejo e higiene adotada na fazenda (DANTAS; SILVA; NEGRÃO, 2010; OLIVEIRA et al., 2013; PEREES NETO; ZAPPA, 2011).

A *mastite* ou *mamite* é um processo inflamatório da glândula mamária causada por diversos agentes (YUNHE et al., 2013). Os mais comuns são as bactérias dos gêneros *Streptococos* e *Estafilococos* além do gênero *Coliformes*. Estima-se que no rebanho

brasileiro a prevalência da doença seja de 20 a 38%, o que representaria uma perda de 12 a 15% da produção (VILELA, 2011).

Existem dois tipos de mastite: a clínica que pode ser facilmente percebida uma vez que os sinais clínicos são evidentes, como edema, endurecimento e dor na glândula mamária e/ou aparecimento de grumos ou pus no leite, e ainda sintomas sistêmicos como depressão, desidratação, diminuição da ingestão de alimento e queda na produção de leite; e a mastite subclínica, neste caso há ausência de alterações visíveis, contudo, ocorre queda na produção e mudança na composição do leite (aumento da Contagem de Células Somáticas (CCS), íons Cl^- e Na^+ e de proteína sérica, e diminuição de caseína, lactose e gordura) (BORNE et al., 2010; DURR, 2012; OLIVEIRA; LANGONI; HULLAND, 2012).

Nesse contexto, estudos que viabilizem o tratamento para uma das principais causas da má qualidade do leite no Brasil, a mastite, se tornam extremamente relevante. A mastite determina perdas elevadas por descarte do leite, gastos com medicamentos, perda funcional de glândulas e pode até levar o animal ao óbito, o que pode causar prejuízos de 5% a 10% no faturamento das propriedades afetadas por ela (SIMÕES; OLIVEIRA, 2012).

Segundo estudos realizados pela Embrapa, a novidade para o tratamento de mastite é o emprego da nanotecnologia, ciência que surgiu há duas décadas com a promessa de se tornar uma revolução ao manipular átomos e moléculas em uma microescala com microscópios especiais (KISS, 2012). O desenvolvimento de materiais em escala nanométrica para este fim tem sido uma alternativa encontrada pelos pesquisadores da área.

2.2 NANOPARTÍCULAS E O TRATAMENTO DE MASTITE

Atualmente, há um interesse significativo na exploração de nanopartículas para aplicações biomédicas, incluindo a atividade antimicrobiana e a liberação controlada de fármacos (MISRA et al., 2012). A administração de antibióticos por nanopartículas ao local da infecção é uma terapia promissora, particularmente para a liberação controlada, o que por sua vez diminui a dose necessária para alcançar o efeito clínico desejado (ALLAHVERDIYEV et al., 2011; LIU et al., 2009). Para este fim, as nanopartículas biodegradáveis têm ganhado maior destaque (ALLAHVERDIYEV et al., 2011).

O destino das nanopartículas *in vivo* depende das interações que ocorrem entre a superfície das nanopartículas e os componentes biológicos ao redor dela. Além disso, deve ser levado em conta que um bom dispositivo de liberação de antibiótico deve ter facilidade de

penetrar nas células fagocitárias, cujo meio é ácido, de forma que não haja perda de atividade ou degradação do antibiótico (CASTANHEIRA, 2012; LIU et al., 2009).

Outro aspecto interessante é que a superfície dos vetores para administração em mucosa tenha caráter bioadesivo, permitindo seu aprisionamento no muco glandular e manutenção prolongada do vetor no sítio de ação, fazendo com que o vetor libere o antibiótico de maneira sustentada e diretamente no foco desejado (CASTANHEIRA, 2012).

O tratamento utilizando sistemas nanoestruturados tem apresentado maior eficiência porque as nanopartículas apresentam tamanho menor que a célula, atingindo assim compartimentos biológicos (processo de fagocitose) que as formulações farmacêuticas convencionais não têm acesso, sendo assim sua ação é extra e intracelular. O grande problema dos tratamentos convencionais é que o antibiótico tem ação somente extracelular, uma vez que a membrana celular funciona como uma barreira biológica que impede sua entrada na célula, além disso, ação do antibiótico na forma convencional não é prolongada, exigindo do tratamento aplicações diárias e em altas concentrações (Figura 1) (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2016).

Uma característica importante destes dispositivos nanoparticulados é que eles são preparados para que o antibiótico seja liberado de forma controlada e direcionada ao longo de seu trajeto pelo organismo, atingindo as bactérias em todos os compartimentos biológicos (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2016).

Por ser mais eficiente e utilizar de forma mais racional os antibióticos, a nanoestrutura dificulta a seleção de bactérias resistentes, aumentando a vida útil do fármaco.

Neste sentido, o princípio da solução com nanotecnologia é uma alternativa que vem ganhando destaque. A área afetada por uma infecção apresenta mais células de defesa, como por exemplo, os polimorfonucleares (PMN). Com capacidade fagocitária, essas células absorvem simultaneamente o agente invasor e a nanopartícula contendo antibiótico. Uma vez dentro da célula de defesa, o antibiótico é liberado e atinge diretamente as bactérias já fagocitadas, neste ponto é feita uma liberação controlada e direcionada do antibiótico diretamente no local onde o agente causador da doença fica protegido das formulações convencionais (AGÊNCIA MINAS GERAIS, 2016).

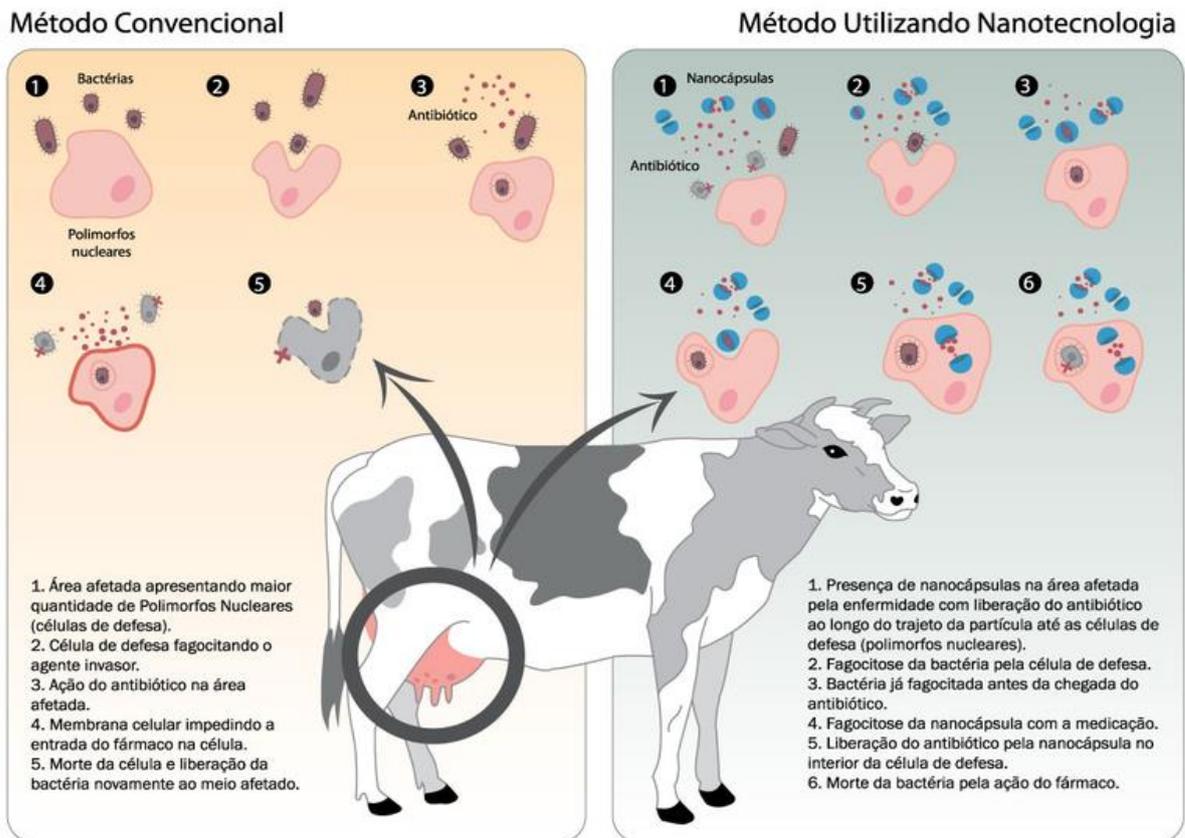


Figura 1 – Comparação entre o tratamento convencional e o uso da nanotecnologia.

Fonte: Agência Minas Gerais, 2016.

2.3 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam tamanho menor do que 1000 nm, sendo que a maioria varia entre 100-500 nm (SOPPIMATH; AMINABHAVI; KULKARNI, 2001). O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (Figura 2) (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido de maneira física e uniforme (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; REZENDE et al., 2003).

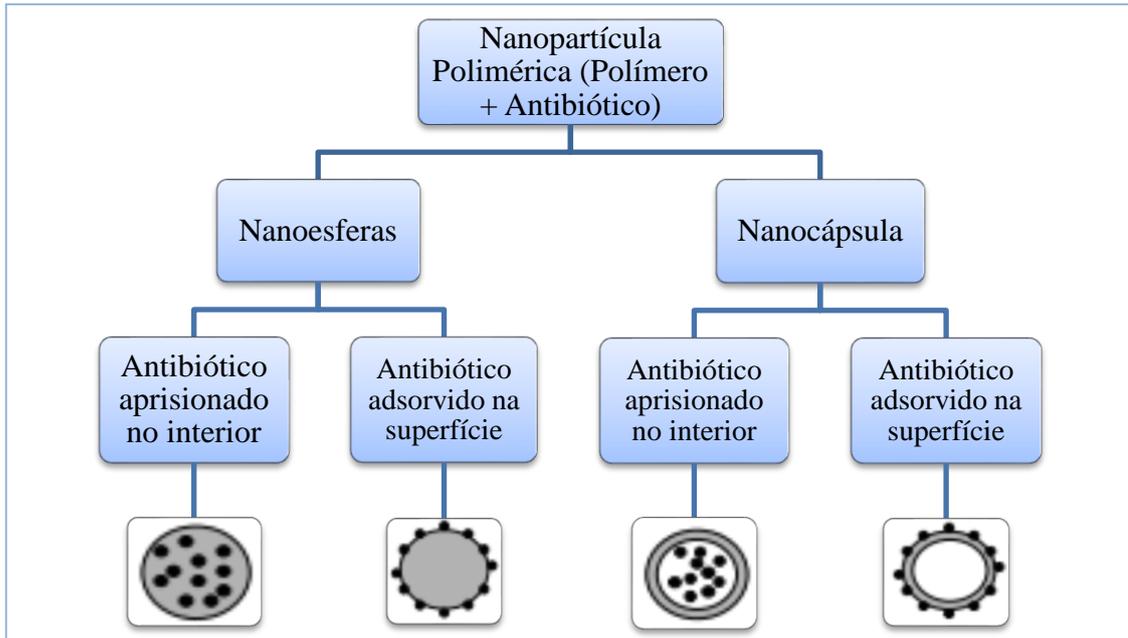


Figura 2 – Representação esquemática de nanopartículas poliméricas de acordo com a organização estrutural.

Fonte: Adaptado de Kumari; Yadav; Yadav (2010).

Os polímeros sintéticos biodegradáveis são sistemas muito aplicados para a entrega controlada e direcionada de fármacos. Os polímeros de poliéster derivados do (poli) ácido láctico (PLA), do ácido poli-glicólico (PGA) e do ácido láctico-co-glicólico (PLGA) são extensamente estudados em função das suas características biodegradáveis e biocompatíveis (JEEVITHA; AMARNATH, 2013).

A quitosana (um polissacarídeo catiônico) além de suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade têm sido incorporada às formulações para fornecer potencial de superfície positivo às partículas, objetivando facilitar a interação destas com as membranas biológicas fosfolipídicas, além de prevenir a desestabilização das nanoestruturas de poliéster devido à adsorção de cátions e proteínas catiônicas presentes nos fluidos biológicos (REZENDE et al., 2003).

2.4 QUITOSANA

A quitosana é um polímero natural e hidrofílico produzido a partir da N-desacetilação parcial da quitina, componente da parede celular de fungos e do exoesqueleto de artrópodes, sendo formada a partir de unidades $\beta(1,4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose e $\beta(1,4)$ -2-

acetamido-2-desoxi-D-glicopiranoose, sua estrutura molecular pode ser vista na Figura 3 (CASTANHEIRA, 2012; DIAS et al., 2013).

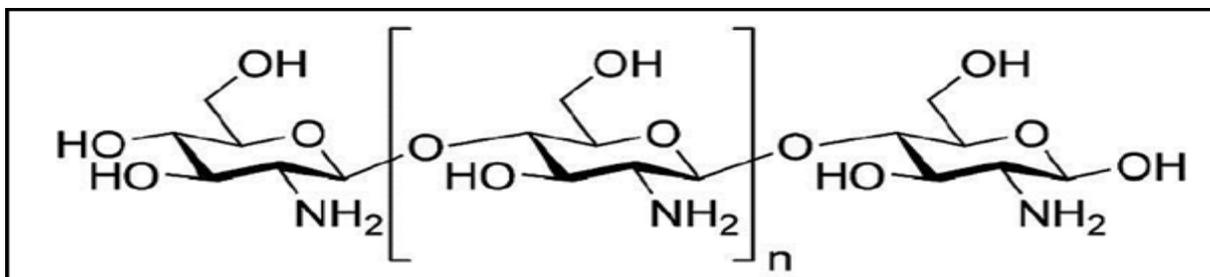


Figura 3 – Estrutura molecular da quitosana.

Fonte: Belmiro; Mota (2013, p. 14).

Na estrutura da quitosana estão presentes três tipos de grupos funcionais reativos, que são dois grupos hidroxil (um primário e um secundário) e um grupo amino, sendo que os grupos amino livres tem importante papel em relação à solubilidade da quitosana (DIAS et al., 2013).

A quitosana possui características de biodegradabilidade e biocompatibilidade e baixa imunogenicidade (MENG; STURGIS; YOUAN, 2011). Em pH ácido, seus grupamentos amino estão protonados, transformado-se em um polycátion que lhe confere característica de mucoadesividade (CASTANHEIRA, 2012).

Essa característica bioadesiva pode ser definida como o estado em que dois materiais, sendo ao menos um de natureza biológica, são mantidos juntos por prolongados períodos de tempo através forças interfaciais. Os grupos amina da quitosana, atuam por interação eletrostática com o muco carregado negativamente, que é dependente do pH do meio, essa grande adesividade nos tecidos mucosos, é denominada mucoadesividade (CARVALHO et al., 2014; LYRA; SOARES-SOBRINHO; BRASILEIRO, 2007).

No que diz respeito à aplicabilidade, essa é uma importante propriedade, uma vez que, o ideal é que parte das nanopartículas fiquem retidas no muco glandular até que haja a formação da barreira física de queratina pelo organismo do animal, impedindo assim a entrada de patógenos.

Outras propriedades biológicas da quitosana estão no fato de ela possuir atividades antioxidante, permitindo complexação com metais; antimicrobiana, anti-colesterolêmica, promovendo interação eletrostática com ácidos graxos no aparelho digestivo; e analgésica, removendo prótons da área inflamada e aumentando o pH (DIAS et al., 2013).

O mecanismo por trás da atividade antimicrobiana da quitosana se deve à sua natureza catiônica que faz com que ela se ligue com o ácido siálico em fosfolipídios, restringindo o movimento de substâncias microbiológicas. Além disso, a quitosana oligomérica penetra nas células de micro-organismos e previne o crescimento de células, evitando a transformação de DNA em RNA (SASHIWA; AIBA, 2004).

Neste contexto a quitosana tem sido um produto amplamente utilizado para liberação controlada de fármaco. Sua capacidade de ficar carregada positivamente permite um aumento no tempo residual do fármaco no local de absorção e um aumento na permeabilidade das membranas, ou seja, seus grupamentos amino protonados interagem com os sítios carregados negativamente nas superfícies celulares, resultando em um tempo maior de permanência no sítio de absorção, podendo promover aumento da biodisponibilidade, o que favorece seu uso como nanopartículas (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; JUNGINGER; VERHOEF, 1998).

Além disso, a quitosana é um polímero compatível com tecidos vivos e se degrada a metabólitos (amino açúcares) que são completamente absorvidos pelo organismo (TAVARES, 2011).

2.5 ÁCIDO POLILÁTICO

O Poli Ácido Lático ou Ácido Polilático (PLA) é um poliéster alifático, obtido por polimerização do ácido lático que é o seu constituinte básico. A fonte de ácido lático pode ser encontrada na maioria dos açúcares obtidos na agricultura, dentre eles a lactose do soro de leite. O PLA tem sido amplamente utilizado na liberação controlada de fármaco devido à sua excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e elevada capacidade de encapsulação de fármacos hidrofóbicos (GIBELLI, 2012).

O principal mecanismo de degradação do PLA ocorre através da hidrólise nas ligações éster (Figura 4). Tal degradação ocorre em função do tempo, embora a uma baixa velocidade, se a temperatura e o pH estiverem controlados.

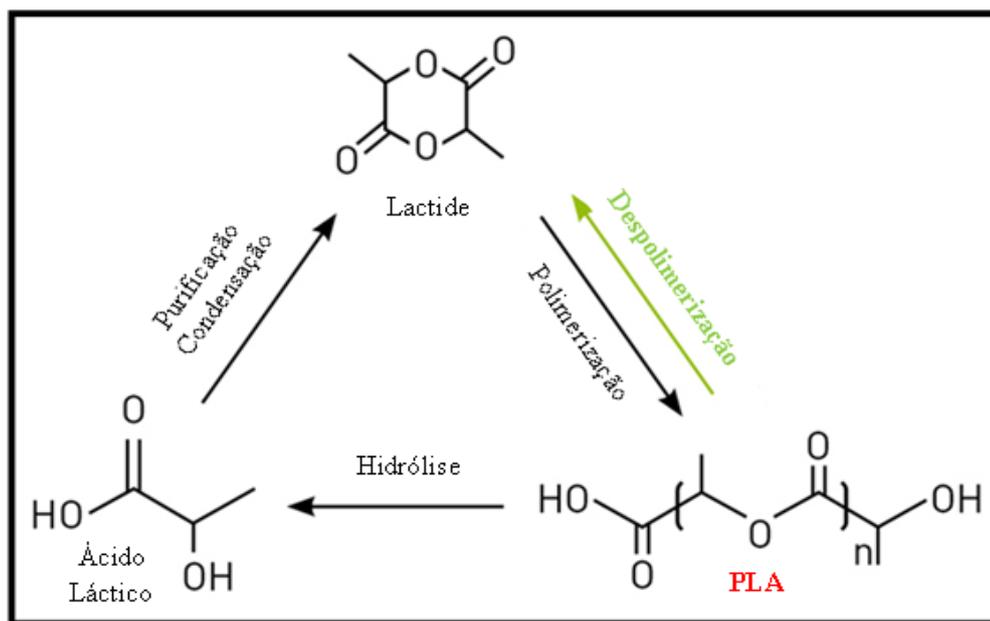


Figura 4 – Síntese de PLA de alto peso molecular.

Fonte: Adaptado de Mekonnen et al. (2013).

O PLA possui alta resistência, alto módulo de elasticidade, pode ser obtido de fontes renováveis e é utilizado para produção de dispositivos biocompatíveis e bioabsorvíveis. Possui elevada cristalinidade e baixa hidrofiliidade, o que reduz sua taxa de degradação (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; CHINH et al., 2015; DEV, A. et al., 2010; WANG, W. et al., 2015).

Outro fator importante é que o PLA pode gerar cargas negativas na superfície de partículas. Além disso, esse polímero possui características hidrofóbicas, o que torna sua superfície acessível à opsonização e posterior fagocitose (MAINARDES, 2007), ou seja, facilita a ação do sistema imunológico por fixar opsoninas ou fragmentos do complemento na superfície bacteriana, permitindo a fagocitose.

Neste contexto, associação do PLA a quitosana se torna interessante, uma vez que a quitosana devido à forte ligação de hidrogênio intermolecular, afixa-se a superfícies de PLA formando um material hidrofílico-hidrofóbico biodegradável (JEEVITHA; AMARNATH, 2013; THI et al., 2011; VAUTHIER et al., 2003), a presença de uma cobertura hidrofílica na superfície promove a estabilização estérea que repele as proteínas plasmáticas; esse sistema também garante uma liberação lenta e contínua, tendo em vista que o PLA se degrada lentamente e a degradação pode ser controlada em função do pH (MAINARDES, 2007). Além disso, os grupos amino na molécula de quitosana têm maior condutividade iônica que

contribuem para o aumento da densidade de carga do polímero durante o processo de síntese (JEEVITHA; AMARNATH, 2013; THI et al., 2011; VAUTHIER et al., 2003).

2.6 LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACO

A liberação controlada de fármacos tem como objetivo o controle temporal e espacial, *in vivo*, da concentração de fármacos promovendo o benefício clínico da administração destes e a redução dos efeitos adversos (COIMBRA, 2010; KUMAR, 2000).

Formas de dosagem convencionais muitas vezes levam a grandes variações nas concentrações séricas do fármaco. A maioria do conteúdo da droga é liberada logo após a administração, fazendo com que os níveis da droga no corpo subam rapidamente, gerando um pico para um posterior decaimento acentuado (COIMBRA, 2010; KUMAR, 2000).

A liberação controlada implica a associação, química ou física, dos fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas que, quando administrados *in vivo*, tenham a capacidade de controlar, de forma pré-determinada, a taxa de liberação do fármaco a partir desse mesmo sistema, e/ou conduzir o fármaco até ao sítio específico em que este deve atuar (COIMBRA, 2010).

Uma nova dimensão é a incorporação de biodegradabilidade no sistema. Muitos polímeros degradáveis são potencialmente úteis para este fim, incluindo materiais sintéticos, bem como as substâncias naturais. A liberação de drogas, absorvidas ou encapsuladas por polímeros, envolve a sua difusão lenta e controlável através de materiais poliméricos. Drogas ligadas covalentemente a polímeros biodegradáveis ou dispersas numa matriz polimérica de tais macromoléculas pode ser liberada por erosão ou degradação do polímero. Moléculas terapêuticas, complexadas por polímeros, também podem ser liberadas a partir de gel por difusão (KUMAR, 2000).

2.6.1 Gentamicina

A gentamicina é um antibiótico bactericida, hidrofílico e de baixo peso molecular da família dos aminoglicosídeos, que age por inibição normal na síntese proteica de microorganismos suscetíveis: *Echericha coli*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, espécies de

Klebsiella – *Enterobacter* – *Serratia*, espécies de *Citrobacter* e espécies de *Staphylococcus*, *Salmonella* e *Shigella* (BULASMED, 2014).

Este medicamento tem sido um dos mais utilizados devido ao seu baixo custo, seu largo espectro de ação antibacteriana, excelente estabilidade e solubilidade a elevadas temperaturas e baixo índice de alergia, além de possuir baixa taxa de patógenos resistentes (CHANGEZ et al., 2004; FRUTOS; BARRALES-RIENDA, 2002; VIRTO et al., 2003). Sua estrutura química está apresentada na Figura 5.

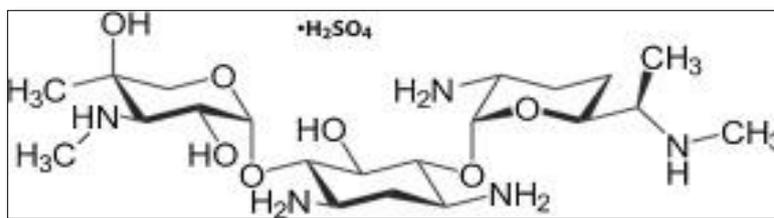


Figura 5 – Estrutura química do sulfato de gentamicina.

Fonte: Wers et al. (2015).

2.7 MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Geralmente, nanopartículas poliméricas são preparadas a partir de polímeros pré-formados ou por polimerização direta de monômeros. Independentemente do método de preparação, os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas. Alguns dos métodos mais utilizados a partir de polímeros pré-formados são: emulsificação-evaporação de solvente, *salting-out*, diálise, deslocamento do solvente, emulsificação-difusão do solvente e a tecnologia de fluidos supercríticos (RAO; GECKELER, 2011).

Por outro lado, as nanopartículas poliméricas podem ser sintetizadas diretamente pela polimerização de monômeros utilizando várias técnicas de polimerização tais como microemulsão, nanoemulsão, emulsão isenta de surfactante e polimerização interfacial.

A escolha do método de preparação deve ser feita com base em vários fatores, tais como o tipo de sistema polimérico, a área de aplicação e a exigência do tamanho das partículas (RAO; GECKELER, 2011).

Em regra, a escolha de um método de preparação é determinada pelas características de solubilidade do princípio ativo.

Em comparação com os métodos de produção de nanopartículas poliméricas a partir da polimerização de monômeros, a preparação utilizando polímeros pré-formados é mais facilmente controlável e de maior rendimento (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

2.8 MÉTODO DE SÍNTESE E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS

O método escolhido para a síntese das nanopartículas foi o de emulsificação – evaporação de solvente.

Neste método, o polímero e o princípio ativo desejado são primeiramente dissolvidos em solventes voláteis. Posteriormente, a solução de polímero/princípio ativo é emulsionada em uma solução aquosa de tensoativo e o solvente orgânico é então evaporado, deixando um coloide de polímero composto com um princípio ativo estabilizado por surfactante (RAO; GECKELER, 2011; YIN et al., 2007).

Nos métodos convencionais, as duas principais estratégias para a formação de emulsões são: a preparação de emulsões simples, por exemplo, óleo em água (O/A) ou as emulsões duplas, por exemplo, (água em óleo) em água, (A/O/A) (RAO; GECKELER, 2011).

Estes métodos utilizam homogeneização a altas velocidades ou ultrassons, seguida por evaporação do solvente, quer por agitação magnética contínua à temperatura ambiente ou sob pressão reduzida (RAO; GECKELER, 2011).

Por não requerer temperaturas elevadas e nem agente indutor de separação de fases, tem sido um dos métodos mais utilizados (ZHANG et al., 2013). As características físico-químicas das nanoesferas obtidas por este método são afetadas por um conjunto de parâmetros tecnológicos, que incluem solubilidade do princípio ativo, natureza e quantidade do solvente orgânico, concentração do polímero, natureza e concentração do tensoativo, o modo e a duração da agitação da emulsão e da temperatura necessária para evaporação do solvente (ABDI et al., 2010; DORATI et al., 2008; LEE et al., 2011; LEE; MCCLEMENTS, 2010; LEMOS-SENNA et al., 1998; MCCLEMENTS, 2010; PERUGINI et al., 2002; POOJA et al., 2016; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; TEO et al., 2017, 2016; YIN et al., 2007; ZHANG et al., 2013)

O solvente orgânico é selecionado com base na sua miscibilidade em água, ponto de ebulição e segurança, o mesmo deve apresentar características apolares, ter capacidade de solubilizar o polímero e difundir-se facilmente através da fase aquosa, de modo a permitir a

precipitação do polímero e a formação de nanoesferas (LEE et al., 2011; LEE; MCCLEMENTS, 2010; PERUGINI et al., 2002; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

A obtenção de nanoesferas com dimensões reduzidas e com uma distribuição homogênea de tamanhos é determinada pelo uso de um baixo volume de solvente orgânico (LEE; MCCLEMENTS, 2010). A concentração do polímero na emulsão altera a viscosidade da suspensão o que também interfere no tamanho das partículas formadas (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

Outro parâmetro importante nas dimensões das partículas é a natureza e concentração do tensoativo utilizado. O aumento da concentração de tensoativos de baixa massa molar aumenta a proteção das nanoesferas contra a coalescência, resultando numa emulsificação mais eficaz e em nanoesferas de menores dimensões (LEMOS-SENNA et al., 1998; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

A emulsificação de um solvente orgânico apolar numa fase aquosa, por agitação, origina, na maioria dos casos, gotículas com dimensões entre 2 e 5 μm . Para obtenção de gotículas com dimensões inferiores a 1 μm torna-se necessário submeter a emulsão a uma tensão de cisalhamento elevada e promover um aumento na temperatura para evaporação do solvente (LEE; MCCLEMENTS, 2010; PERUGINI et al., 2002; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos propostos incluíram síntese, caracterização e rotas de aplicação de nanopartículas no tratamento de mastite.

3.1 MATERIAIS

Quitosana em pó de médio peso molecular (Sigma-Aldrich, EUA) com grau de desacetilação entre 75% e 85%, foi utilizada. O PLA (M_n 116848, polidispersividade: 1.67) utilizado no experimento foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Lucia Helena Innocentini Mei da Universidade Estadual de Campinas e caracterizado de acordo com Santos (2014).

A solubilização da quitosana foi feita utilizando ácido acético glacial da Proquímios, de peso molecular 60,05 g/mol, pureza mínima de 99,8% e densidade de 1,05 g/cm³. Assim como para solubilizar o PLA foi utilizado diclorometano (DCM) de peso molecular 84,93 g/mol e densidade de 1,33 g/cm³ (Proquímios). Tween 80® (Fagron, Brasil) foi o tensoativo utilizado para formação da emulsão.

O Sulfato de gentamicina injetável (Neo gentamicin) da Neo Química de 280 mg/2mL foi utilizado na preparação das nanopartículas carregadas com antibiótico. Bem como a ninidrina (Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizada no método colorimétrico para determinação da eficiência de encapsulamento do antibiótico as nanopartículas.

3.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.2.1 Preparo das Nanopartículas

As amostras foram preparadas pelo método de emulsificação com evaporação de solvente e o procedimento foi baseado na metodologia descrita por Dev et al. (2010). A solução de ácido acético (0,1% v/v) contendo Tween 80® foi previamente preparada (a cada 100 mL de solução de ácido acético uma gota do surfactante foi utilizada). Para o preparo da amostra 1:0,75 (Proporção em massa de 1PLA para 0,75QUI) 37,5 mg de quitosana foram solubilizadas em 30 mL da solução de ácido acético. Em paralelo, 50 mg de PLA foram dissolvidos em 5 mL de DCM.

Para preparar as amostras com proporções 1:0,50 e 1:0,25 variou-se apenas a quantidade em massa de quitosana, 25mg e 12,5 mg de quitosana, respectivamente. No fluxograma da Figura 6 pode ser observado a descrição detalhada do procedimento experimental.

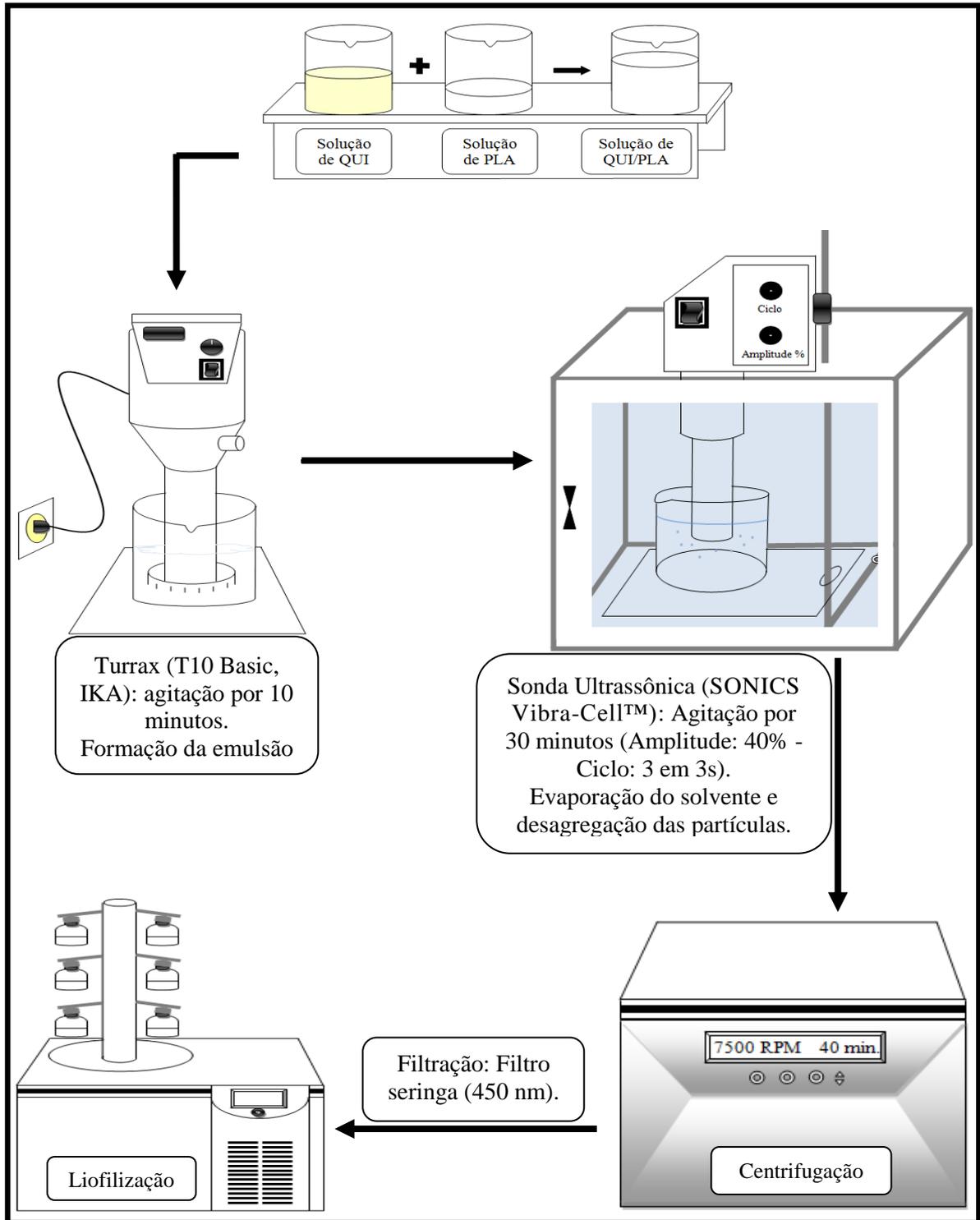


Figura 6 – Procedimento experimental no preparo das nanopartículas.

Fonte: Da Autora.

O procedimento utilizado para incorporar a gentamicina nas nanopartículas de QUI/PLA foi o mesmo descrito anteriormente, porém na parte inicial do procedimento experimental 86 μL (12mg) da suspensão injetável de sulfato de gentamicina foi previamente dissolvida na solução de quitosana.

3.2.2 Tamanho Médio das Nanopartículas

O tamanho médio das nanopartículas foi medido através do diâmetro hidrodinâmico médio, que é determinado pelo espalhamento dinâmico da luz (DLS).

As análises foram feitas no Instituto de Química, da Universidade Estadual Paulista, *campus* Araraquara, o equipamento utilizado foi o *Malvern Zetasizer Nano S*, da *Malvern Instruments Ltd*. Para a análise, 1,0 mg de nanopartículas foram ressuspensas em 1 mL de água destilada.

3.2.3 Potencial Zeta

A medida do Potencial Zeta fornece informações sobre a carga superficial das nanopartículas sendo outra característica importante que se deve determinar para avaliar a estabilidade das nanopartículas em solução (FRONZA; CAMPOS; TEIXEIRA, 2004). As análises foram feitas utilizando-se do método descrito no item 3.2.2.

3.2.4 Estabilidade Coloidal em função do pH

As análises de potencial zeta em função do pH foram feitas em um equipamento *Malvern Zetasizer Nano ZS particle analyzer*, da *Malvern Instruments Ltd* com titulador automático acoplado. Nas análises, 9,0 mg de partículas foram resuspensas em 30 mL de água Mili-Q sob agitação de uma sonda ultrassônica por 2 minutos (Amplitude de 21% e ciclo de 3 em 3s). O ajuste de pH foi feito utilizando soluções de NaOH 0,01M e HCl 0,01M.

3.2.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Todos os componentes utilizados na preparação, bem como as nanopartículas foram submetidos à análise de FTIR, com o objetivo de caracterizar a estrutura e investigar as interações inter- e intramolecular entre os polímeros (QUI e PLA) e o antibiótico. As amostras foram inseridas diretamente no equipamento de análise, onde não é necessário preparo prévio das amostras para leitura. Para as análises, foi utilizado um espectrofotômetro FTIR acoplado a um acessório ATR da Agilent Technologies modelo Cary 630. Os espectros foram coletados de 650 a 4000 cm^{-1} .

3.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das nanopartículas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura. As amostras foram revestidas com ouro utilizando Sputter Coater EMITECH, modelo: K450 (Kent, Reino Unido), com uma espessura de camada estimada em 200 Å. As fotomicrografias foram realizadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura com Detector de Energia Dispersiva de raios X, Modelo: Leo 440i (MEV) e 6070 (EDS) (LEO Electron Microscopy/Oxford - Cambridge, Inglaterra).

3.2.7 Obtenção da curva padrão

A curva padrão que relaciona a concentração de gentamicina com a absorbância utilizada neste trabalho foi obtida em experimentos anteriores. A mesma foi feita utilizando amostras de concentrações conhecidas a partir da diluição da solução injetável de gentamicina de 280 mg/2mL. Cinco amostras foram preparadas pelo método de diluição em série (280,0; 143,0; 70,0 e 57,3 $\mu\text{g/mL}$). Para o ponto com concentração de gentamicina igual a zero (branco da curva), foi utilizado uma solução tampão fosfato de sódio (PBS) 0,2 M.

A determinação da concentração de gentamicina para elaboração da curva padrão foi obtida pelo método colorimétrico proposto por Frutos et al. (2000). A um tubo de ensaio contendo 1 mL de solução de gentamicina de concentração conhecida, foram adicionados 4 mL de solução tampão de fosfato de sódio 0,2 M (pH 7,4) e, em seguida, 1,5 mL de solução de ninidrina (0,0125 g/mL). Posteriormente, o aparato contendo os tubos foi colocado em

banho-maria a 95°C por 15 minutos. Para resfriar o sistema e parar a reação os tubos foram submetidos a um banho de gelo por 5 minutos.

Finalmente as amostras foram colocadas em cubetas de quartzo para medição da absorvância a 400 nm em um espectrofotômetro de UV-Vis modelo Cary 60 (Agilent Technologies).

3.2.8 Eficiência do Encapsulamento do Fármaco

A suspensão obtida foi centrifugada a 10000 RPM por 25 minutos (Centrífuga HT – MCD -2000), o sobrenadante foi diluído duas vezes e 1 ml do mesmo foi submetido ao método colorimétrico descrito no item 3.2.5. A solução foi medida pelo espectrofotômetro de UV-Vis modelo Cary 60 (Agilent Technologies). A massa do antibiótico remanescente foi calculada usando a curva de calibração da gentamicina.

$$\text{Eficiência de Encapsulamento} = \frac{\text{Massa da gentamicina na Nanopartícula}}{\text{Massa da gentamicina Inicialmente}} \times 100$$

Para se comprovar a presença de gentamicina foi utilizada a Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada com um detector de EDS para quantificação de enxofre referente ao sulfato de gentamicina.

3.2.9 Liberação de gentamicina *in vitro*

A liberação controlada de gentamicina foi medida através do método colorimétrico, esse método baseia-se na reação da ninidrina com as aminas primárias e secundárias, tais como aquelas presentes no sulfato de gentamicina (FRIEDMAN, 2004), produzindo soluções de diferentes colorações de acordo com a concentração, ou seja, para soluções concentradas (púrpura) e soluções diluídas (amarelo).

Tendo em vista essas informações deve-se ressaltar que a quitosana também possui esse tipo de grupo funcional o que dificulta a análise, porém para se minimizar esse tipo de erro foi utilizado para cada uma das formulações um branco, que correspondeu às amostras

sem gentamicina, de forma que as interações da ninidrina com a quitosana fossem desprezadas.

Nos ensaios 4 mg de nanopartículas (carregadas e não carregadas com gentamicina) foram redispersa em 1 mL de água destilada e posteriormente colocadas em uma membrana de diálise com um corte molecular de 3,5 kDa, que foi amarrado e colocado em uma solução tampão fosfato (PBS) a pH 7,4. Todo o sistema foi mantido a 37°C e com agitação constante em um shaker modelo TE-424 (Tecnal). Em períodos predeterminados (2, 4, 6, 24, 48,72 e 96 horas), uma alíquota de 1 mL do meio foi removida e a quantidade de antibiótico foi medida no UV-Vis após reação colorimétrica. O antibiótico liberado foi medido pela curva de calibração mencionada no item 3.2.7 e o experimento foi feito em triplicata. Vale destacar que o meio foi repostado a cada alíquota retirada, afim de que o volume do meio permanecesse sempre constante.

Tal procedimento foi repetido a cada 24 horas por 4 dias. Ao final das 96 horas, 1 ml de meio foi coletado e o mesmo foi totalmente substituído, afim de se verificar o efeito da concentração do antibiótico no meio na liberação de gentamicina das nanopartículas. Além disso, uma medição complementar foi realizada na suspensão de nanopartículas após o período de liberação in vitro, com o intuito de obter a concentração de gentamicina não liberada. Os resultados foram discutidos na secção 4.7.1.

3.2.10 Ensaio Microbiológico

Previamente à realização dos experimentos, as colônias de *Staphylococcus aureus* foram recuperadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 37°C por 18 horas. Avaliou-se a suscetibilidade antimicrobiana de acordo com o método de difusão em disco, de acordo com recomendações do CISI (2009a) e com a metodologia descrita por Almeida et al. (2014). Para tal, discos estéreis de papel filtro receberam uma alíquota de 10 µL de cada suspensão de nanopartícula a ser testada e, em seguida, o disco foi aplicado com pinça estéril sobre uma placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (MH), previamente inoculada com o micro-organismo.

3.2.11 Concentração Mínima de Inibição

A análise da Concentração Mínima de Inibição (CMI) foi feita pelo método de diluições sucessivas, tal índice mede a menor concentração do composto necessária para inibir o crescimento da bactéria após a incubação *in vitro* (ZANON, 2010). No ensaio foi utilizada a bactéria *Staphylococcus aureus*.

O ensaio foi feito utilizando alíquotas de 100 µL de cada amostra em uma concentração de 10 mg/mL de nanopartícula e posteriormente adicionada aos poços da placa com 96 poços, fazendo diluições sucessivas, ainda, foram adicionados os controles positivo e negativo e 100 µL da bactéria inoculada em caldo BHI foi adicionada a cada poço contendo as amostras. A placa foi incubada estaticamente a 37°C por 24 horas.

Após o período de incubação, o método colorimétrico com resazurina sódica 0,01% foi utilizado, aplicando-se 10 µL da solução em cada poço e esperando-se uma hora para realizar a leitura visual dos resultados, em que o azul caracteriza a inatividade bacteriana e o vermelho, a atividade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nas secções a seguir foram discutidas todas as análises proposta e os principais pontos de aplicabilidade do sistema de síntese.

4.1 TAMANHO MÉDIO DAS PARTÍCULAS

As análises de DLS foram feitas primeiramente nas amostras após a filtração. Nesta análise foi possível observar que as amostras carregadas com gentamicina apresentaram polidispersividade relativamente mais alta do que as amostras sem a presença do antibiótico, indicando que o antibiótico utilizado altera a distribuição dos diâmetros das partículas em dispersão (Tabela 1). Esse resultado é coerente quando se observa os gráficos (c), (d) e (e) da Figura 7 onde houve a formação de picos secundários e um alargamento nos picos referentes às nanopartículas carregadas.

Tabela 1 – Tamanho Médio de Partícula e Polidispersividade (PDI) das partículas em suspensão.

Partículas*	Diâmetro Médio (nm)	PDI	Partículas Carregadas*	Diâmetro Médio (nm)	PDI
1:0,75	382,8	0,110	1:0,75	211,7 ¹	0,431
1:0,50	347,1	0,206	1:0,50	209,3 ²	0,307
1:0,25	254,8	0,225	1:0,25	141,0	0,297

¹ Presença de um pico secundário com diâmetro médio de partículas em 626,0 nm.

² Presença de um pico secundário com diâmetro médio de partículas em 391,4 nm.

*pH=4,0

Fonte: Da Autora

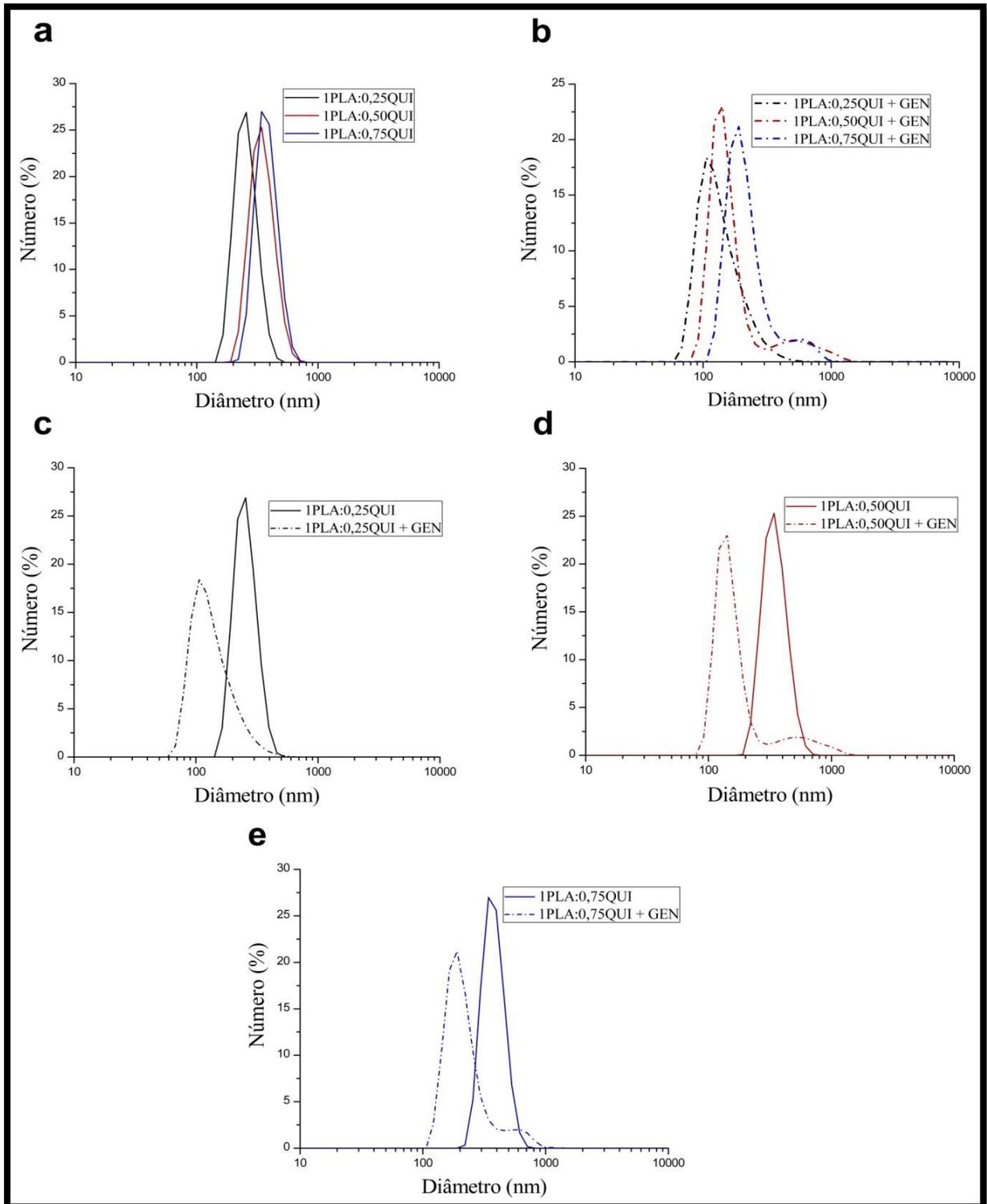


Figura 7 – Gráficos de DLS após a filtração: (a) Nanopartículas (b) Nanopartículas carregadas. Comparativo entre nanopartículas e nanopartículas carregadas: (c) 1:0,25 (d) 1:0,50 (e) 1:0,75.

Fonte: Da autora

Estudos feitos com nanopartículas de 4-CBS-quitosana/PLA sintetizadas via ionização por electropulverização apresentaram resultados de tamanho médio de partículas aproximado aos obtidos neste trabalho (SONGSURANG et al., 2013). Já as nanopartículas de Quitosana/PLA obtidas por Dev et al. (2010), Wang et al. (2015) e Jeevitha; Amarnath (2013), utilizando uma rota de síntese similar a utilizada, apresentaram diâmetros médios semelhantes aos da Tabela 1. Pela análise do gráfico (a) e (b) da Figura 7 e dos valores apresentados na Tabela 1 também foi possível observar que à medida que a proporção de quitosana foi diminuída houve uma redução no tamanho médio de partícula.

De acordo com a Literatura, tamanho médio de partículas acima de 300 nm é propício à fagocitose e a macropinocitose devido ao desencadeamento da opsonização das partículas, tal mecanismo permite a remoção de partículas estranhas, de células hospedeiras em excesso ou danificadas dentro de um organismo (JONES; GRAINGER, 2009; WATSON; JONES; STEPHENS, 2005). Esse processo faz com que essas células absorvam simultaneamente o agente invasor e a nanopartícula contendo antibiótico. Uma vez dentro da célula de defesa, o antibiótico é liberado e atinge diretamente as bactérias já fagocitadas.

Já as partículas menores que 300 nm são mais propícias à adesão e interação celular de superfície (HE et al., 2010). Vale lembrar que todas essas interações dependem de uma série de fatores, como por exemplo, carga de superfície e propriedades físico-químicas da superfície das partículas (HE et al., 2010).

Em uma segunda análise DLS, as nanopartículas liofilizadas foram redispersas em água para verificar a aglomeração das partículas. Essas análises mostraram picos mais alargados (Figura 8), o que justifica um aumento na polidispersividade das suspensões e indicam a formação de aglomerados. O processo de liofilização é interessante no que diz respeito ao ajuste do pH, tendo em vista que o mesmo era de 4, antes da liofilização e passou a 7,0 após a secagem (pH próximo do pH de aplicação).

Apesar do aumento das partículas, o tamanho médio de partículas (Tabela 2) se manteve adequado para a aplicação proposta, principalmente para o processo de fagocitose.

Tabela 2 – Tamanho Médio de Partícula e Polidispersividade (PDI) das partículas em redispersas após a liofilização.

Partículas	Diâmetro Médio (nm)	PDI	Partículas Carregadas	Diâmetro Médio (nm)	PDI
1:0,75	234,0	0,304	1:0,75	463,9	0,450
1:0,50	306,8	0,473	1:0,50	549,7	0,409
1:0,25	359,7	0,445	1:0,25	505,4	0,703

Fonte: Da Autora

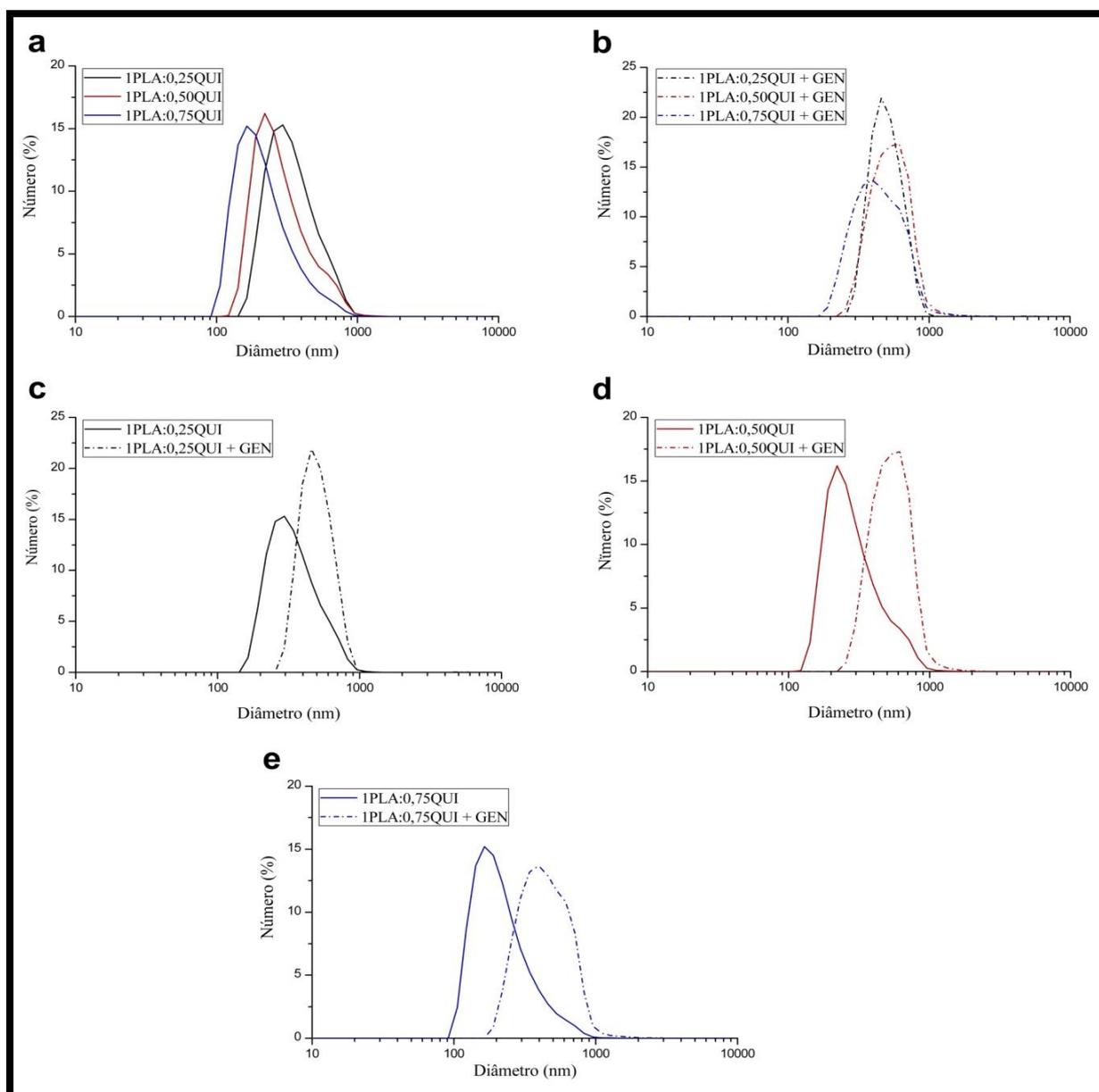


Figura 8 – Gráficos de DLS após a liofilização: (a) Nanopartículas (b) Nanopartículas carregadas. Comparativo entre nanopartículas e nanopartículas carregadas: (c) 1:0,25 (d) 1:0,50 (e) 1:0,75.

Fonte: Da autora

4.2 POTENCIAL ZETA

O potencial zeta é uma característica importante da partícula, pois pode influenciar tanto a estabilidade das partículas quanto a adesão celular. Estudos demonstraram que partículas com um potencial abaixo de -30 mV e acima de +30 mV são mais estáveis em suspensão e apresentam menor agregação. As partículas neutras apresentam menores taxas de opsonização quando comparadas a partículas altamente carregadas (SWAMI et al., 2012; XIAO et al., 2011).

A Tabela 3 mostra os valores de potencial zeta das partículas em suspensão após a filtração. A adição do antibiótico as nanopartículas fez com que o potencial zeta diminuísse. Esse era um resultado esperado já que a gentamicina é um antibiótico hidrofílico assim como a quitosana. Dessa forma, a interação entre o medicamento e a quitosana diminui a disponibilidade de grupamentos amino (carga positiva) disponíveis na superfície da partícula.

Tabela 3 – Medidas de Potencial Zeta após a filtração.

Partículas*	Potencial Zeta (mV)	Partículas Carregadas*	Potencial Zeta (mV)
1:0,75	33,2±0,6	1:0,75	19±1
1:0,50	33±2	1:0,50	23,7±0,3
1:0,25	31±1	1:0,25	12,6±0,6

*pH=4,0

Fonte: Da Autora

Na Tabela 4, o mesmo comportamento pode ser observado para as partículas ressuspensas após a liofilização, o que já era esperado. Também foi possível observar um leve aumento nos valores de potencial zeta nas amostras carregadas com gentamicina após a liofilização.

Tabela 4 – Medidas de Potencial Zeta após a liofilização.

Partículas*	Potencial Zeta (mV)	Partículas Carregadas*	Potencial Zeta (mV)
1:0,75	31±4	1:0,75	25±1
1:0,50	36±1	1:0,50	26±1
1:0,25	24±1	1:0,25	15±1

*pH=7,0

Fonte: Da Autora

Wang, et al. (2015) estudou o efeito da quitosana no potencial zeta das nanopartículas de Quitosana/PLA. Os autores constataram que o aumento da quantidade de quitosana na composição aumenta o potencial zeta. Em uma proporção de 1:0,2 de PLA para Quitosana o potencial zeta foi 22,6 mV, o que se aproximou dos valores encontrados nas partículas que foram sintetizadas em condições semelhantes. Yuan, et al. (2008) sintetizou nanopartículas de quitosana/PLA onde foi feita a modificação de quitosana para que a mesma apresentasse características hidrofóbicas para posterior liberação de rampamicina. Nas medidas de potencial zeta, eles encontraram valores de 30,3 mV, o que fez com que os autores concluíssem que a quitosana recobriu a superfície de PLA, tendo em vista que o PLA apresenta potencial zeta de -35,2 mV.

Diante dos resultados e dos estudos encontrados na literatura é possível que tenha ocorrido a formação de nanopartículas do tipo *core shell* em que o núcleo composto por PLA foi recoberto pela quitosana.

4.3 ESTABILIDADE COLOIDAL EM FUNÇÃO DO pH

Os resultados observados nos gráficos da Figura 9 mostram que as partículas apresentaram superfície com grande quantidade de cargas positivas. Xiao et al. (2011) avaliaram o efeito de partículas com o mesmo tamanho, mas cargas diferentes, quando incubadas com macrófagos de ratos. Os resultados mostraram que partículas com um potencial muito negativo ou muito positivo eram facilmente internalizadas pelos macrófagos. Atualmente, o tratamento de mastite no período seco é o mais estudado. A primeira fase desse período é conhecida como involução ativa. Nessa etapa, os macrófagos, linfócitos e polimorfonucleares são as principais categorias celulares presentes na glândula mamária (BRADLEY; GREEN, 2004).

O período seco é uma fase de mudanças fisiológicas significativas no ciclo produtivo da vaca leiteira, cujo principal objetivo é manter a saúde da glândula mamária, maximizar a produção e a reprodução da vaca leiteira. O tratamento da mastite no período seco se torna interessante, uma vez que, em se tratando da saúde do úbere, neste período existe maior risco de novos casos de mastite logo após a secagem (BRADLEY; GREEN, 2004).

No período de involução ativa a glândula mamária acumula até 75-80% de sua produção diária, atingindo o acúmulo máximo de leite entre 2 a 3 dias após a secagem, desta forma, é possível que ao se fazer a aplicação das nanopartículas ainda haja resíduo de leite

BRADLEY; GREEN, 2004). Normalmente, o leite possui um pH de 6,6 a 6,8 (colostró=6,4). Em caso de mastite este pH se torna alcalino, pois as bactérias acidificam o leite e o organismo, para compensar, libera substâncias alcalinizantes (PEREES NETO; ZAPPA, 2011). Em meio alcalino, as nanopartículas apresentaram menor estabilidade comparado ao meio ácido. Todavia, o meio ácido é encontrado próximo às bactérias, no qual as nanopartículas apresentaram boa estabilidade (Figura 9).

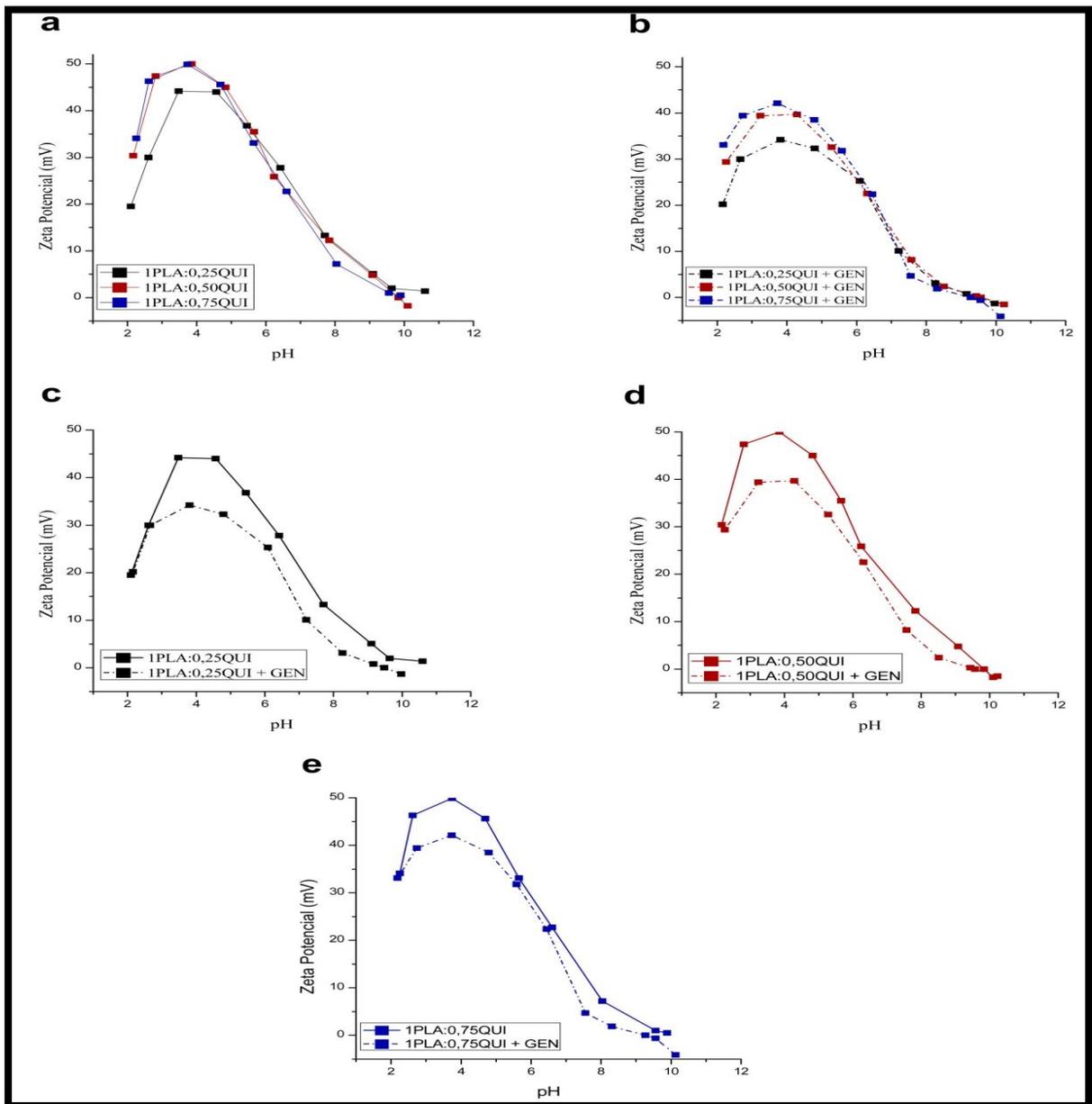


Figura 9 – Gráficos de DLS após a liofilização: (a) Nanopartículas (b) Nanopartículas carregadas. Comparativo entre nanopartículas e nanopartículas carregadas: (c) 1:0,25 (d) 1:0,50 (e) 1:0,75.

Fonte: Da autora

Outro ponto importante é que como o pH de aplicação será levemente ácido, a quitosana estará protonada, o que potencializa suas propriedades de mucoadesividade. Nesse pH é possível também que a gentamicina tenha maior atração pelo PLA, que apesar de hidrofóbico possui muitos grupos $-OH$ disponíveis, do que pela quitosana, já que ambas estarão protonadas, o que gera grande repulsão de cargas. Essa interação da gentamicina pelo PLA pôde ser observada em todas as análises realizadas neste estudo.

4.4 FTIR

Os gráficos correspondentes às análises de FTIR podem ser visualizados na Figura 10. Conforme mostra a Figura 10 (a) e (b), o pico de 1789 cm^{-1} , manifestado em todas as amostras de nanopartículas (carregadas ou não), é referente aos grupos carboxílicos presente nas cadeias laterais do PLA, assim como os picos de 1059 e 1109 cm^{-1} correspondem ao estiramento de C-O, e o pico de 861 cm^{-1} é proveniente do estiramento de CH aldeídico também do PLA (CHIENG et al., 2013; CHINH et al., 2015; HOIDY et al., 2010). Já o pico de 1548 cm^{-1} encontrado em todas as amostras refere-se aos grupos amidas da quitosana, assim como o pico de 1440 cm^{-1} , que pode ser associado ao alongamento das ligações C-C tanto da quitosana quanto do PLA. A banda entre 2850 e 3700 cm^{-1} corresponde às ligações de hidrogênio dos grupos $-OH$. Por fim, as bandas entre 870 a 1190 cm^{-1} são provenientes da estrutura polissacarídica da quitosana (JOSUÉ et al., 2000; WAN et al., 2006; WANG et al., 2015).

O aumento da intensidade e/ou alargamento das bandas evidenciam que houve interações entre os grupos amino, carboxila e hidroxila dos dois componentes. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de nanopartículas de Quitosana/PLA e PLA/Quitosana/PEO (CHINH et al., 2015; JEEVITHA; AMARNATH, 2013).

Nos gráficos (c), (d) e (e) da Figura 10 pôde-se observar que houve um aumento da intensidade do pico de 1632 cm^{-1} referente à vibração das ligações de N-H. Isso se deve aos grupos amina presente na gentamicina (BOO et al., 2015). No geral, foi possível perceber que as maiores alterações ocorreram nas bandas entre 1000 e 1110 cm^{-1} referentes ao estiramento de C-O presente em todos os componentes de síntese. Essas alterações nos espectros indicam que a gentamicina foi encapsulada em todas as formulações de nanopartículas.

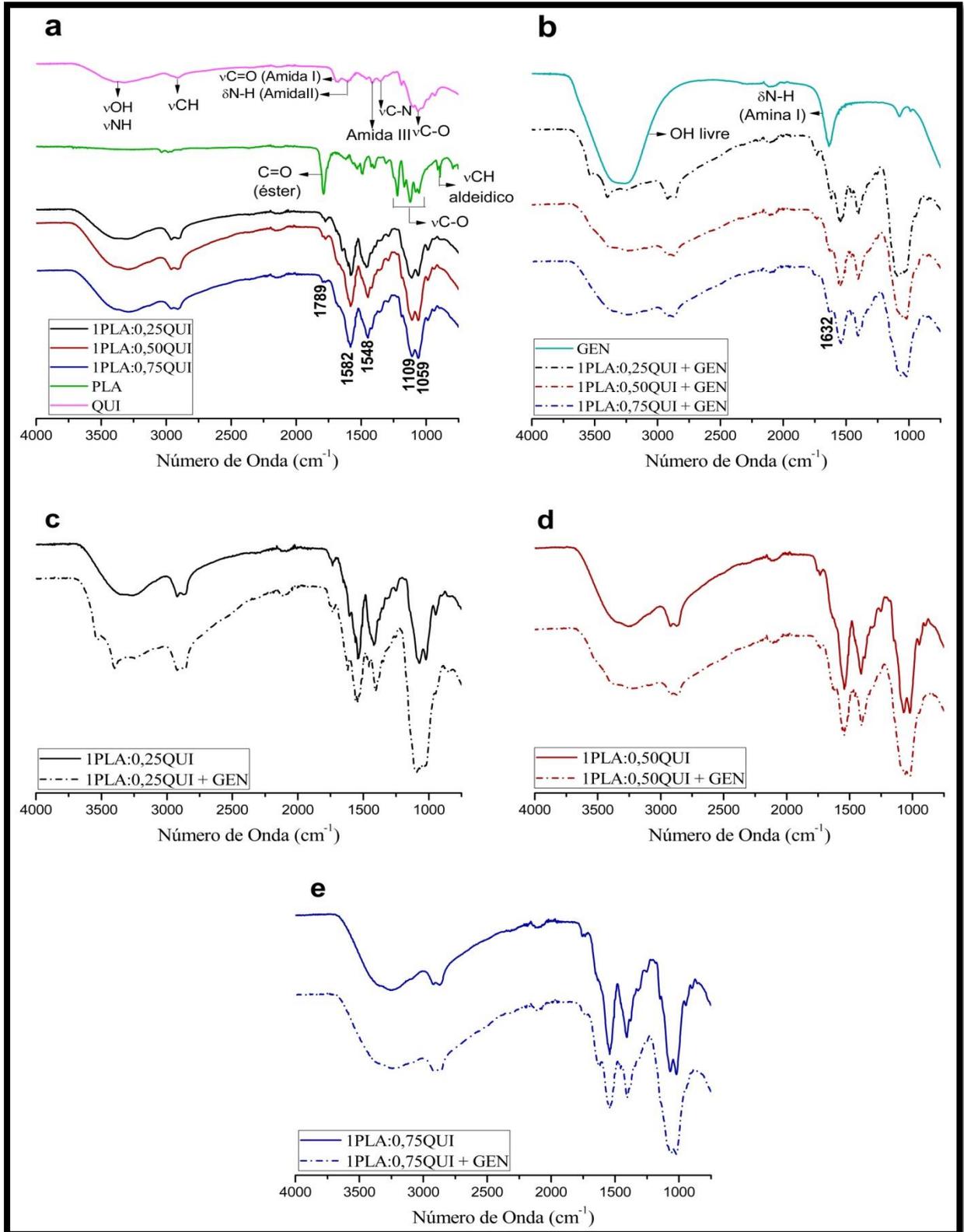


Figura 10 – Espectros de FTIR (% de Transmitância): (a) Nanopartículas e componentes de síntese (b) Nanopartículas carregadas e gentamicina. Comparativo entre nanopartículas e nanopartículas carregadas: (c) 1:0,25 (d) 1:0,50 (e) 1:0,75.

Fonte: Da autora.

4.5 MEV

A morfologia de superfície das nanopartículas foi analisada por MEV (Figura 11).

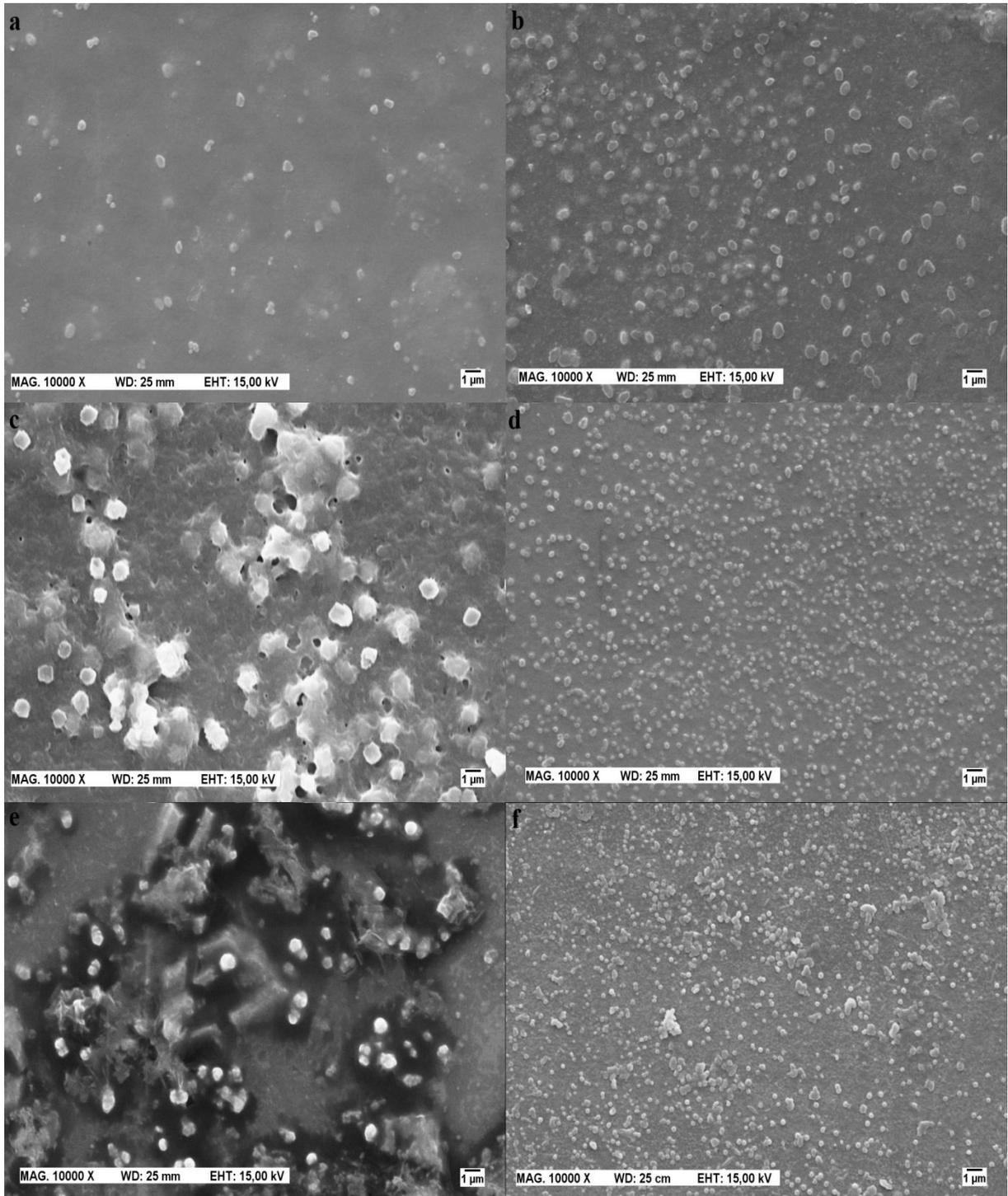


Figura 11 – MEV das nanopartículas após a filtração (a) 1:0,25 (b) 1:0,25 + GEN (c) 1:0,50 (d) 1:0,50 + GEN (e) 1:0,75 (f) 1:0,75 + GEN.

Fonte: Da autora.

As imagens de MEV confirmaram a formação de nanopartículas uniformes. Assim como pela análise de DLS, as nanopartículas com gentamicina apresentaram menor diâmetro quando comparadas com as partículas sem gentamicina, e mesmo apresentando potencial zeta menores, as nanopartículas com gentamicina encontravam-se mais dispersas, enquanto que nas imagens das nanopartículas sem gentamicina observou-se formação de aglomerados, exceto na amostra 1:0,25 (Figura 11 (a)).

Na literatura não há relatos do efeito da gentamicina em nanopartículas com esse tipo de composição. Os trabalhos encontrados estudam a liberação de fármacos hidrofóbicos devido a presença de PLA e ao tipo de síntese (DEV et al., 2010; JEEVITHA; AMARNATH, 2013; WANG et al., 2015), o que não é o caso da gentamicina.

Em contrapartida, foi possível observar nas micrografias o efeito estrutural que a gentamicina apresentou sobre as nanopartículas formadas, diminuindo o diâmetro médio de partículas e aumentando a polidispersividade das mesmas, o que foi um resultado satisfatório neste estudo.

De acordo com Dev et al. (2010), Wang et al. (2015) e Jeevitha; Amarnath (2013) as nanopartículas de quitosana/PLA obtidas foram na ordem de 250 a 350 nm o que se compara com as nanopartículas sintetizadas neste trabalho.

Outro fator importante a ser ressaltado é que o tamanho médio das nanopartículas obtidas nas imagens de MEV aumentou em relação às medidas obtidas por DLS. Isso se deve a uma série de fatores, dentre eles destaca-se a estabilidade coloidal da suspensão obtida. O período de armazenamento pode ocasionar a agregação das nanopartículas no meio, resultando na formação de precipitados. Além disso, problemas de estabilidade química do polímero ou das demais matérias-primas, incluindo o fármaco, podem ocorrer.

Guterres et al. (1995) e Schaffazick; Pohlmann (2002) verificaram limitações quanto a estabilidade físico-química das formulações de nanocápsulas de poli(ácido láctico) contendo diclofenaco, apesar das limitações apresentadas em alguns estudos para este tipo de sistema (GUTERRES et al., 1995; MOLPECERES et al., 2000; REZENDE et al., 2003; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2002), ainda não há nada consolidado na literatura.

Também foi feita micrografias de MEV para as nanopartículas resuspensas em água após a liofilização (Figura 12).

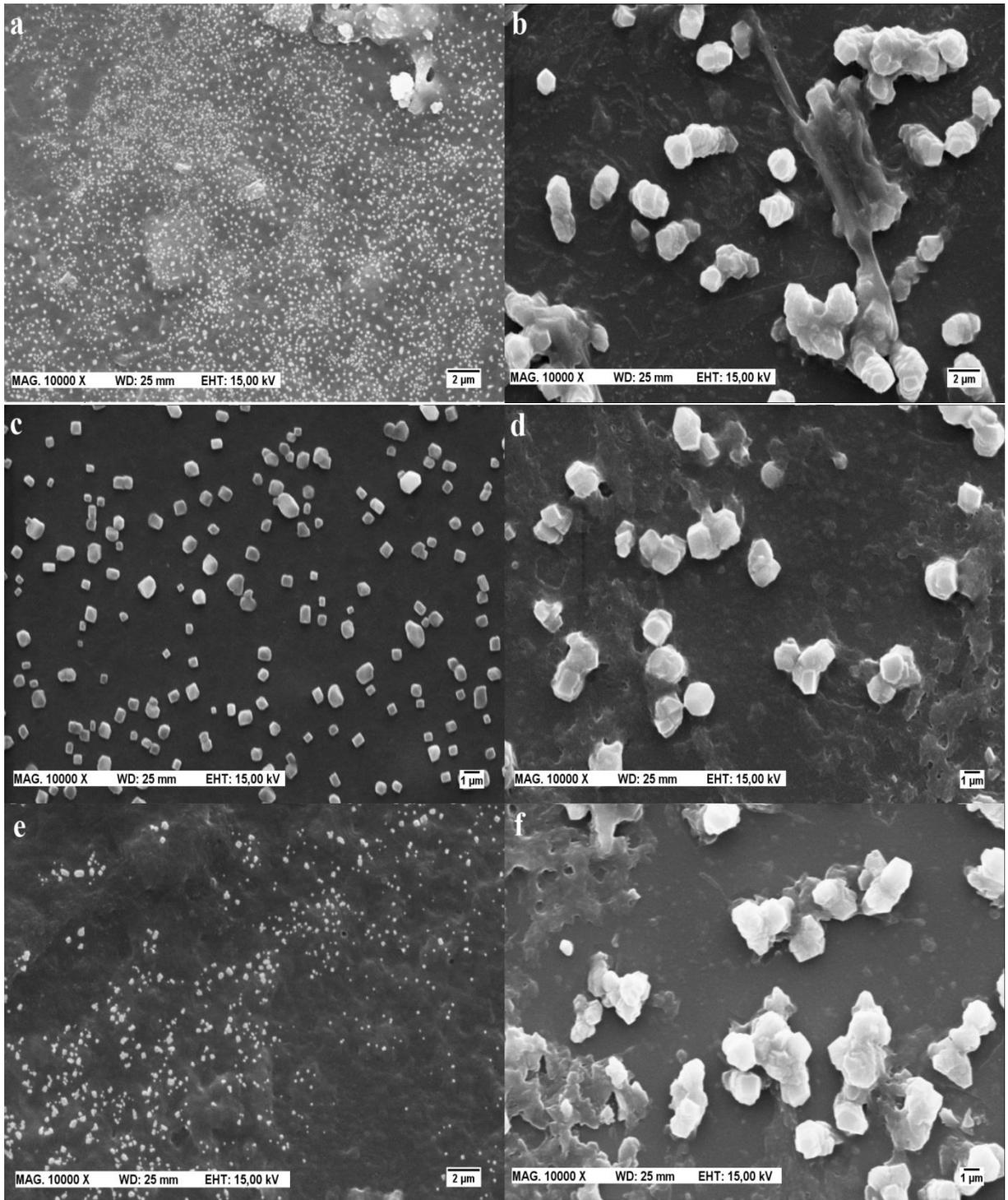


Figura 12 – MEV das nanopartículas ressuspensas após a liofilização (a) 1:0,25 (b) 1:0,25 + GEN (c) 1:0,50 (d) 1:0,50 + GEN (e) 1:0,75 (f) 1:0,75 + GEN.

Fonte: Da autora

Novamente as análises de MEV apresentaram características similares às análises de DLS, neste caso as nanopartículas sem gentamicina apresentaram se mais dispersas e com diâmetro médio menor do que as partículas carregadas com gentamicina.

Vale ressaltar que após a liofilização as partículas foram resuspensas em água e apresentaram boa estabilidade/solubilidade em meio aquoso e neutro.

4.6 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

O resultado de eficiência de encapsulamento foi bastante satisfatório, uma vez que mais da metade da droga foi incorporada nas nanopartículas. A Tabela 5 mostra os resultados obtidos através do método colorimétrico.

Tabela 5 – Eficiência de encapsulamento da gentamicina.

Amostra	Eficiência de Encapsulamento (%)
1:0,25	75,8
1:0,50	68,7
1:0,75	66,7

Fonte: Da autora.

A amostra 1:0,25 foi a que apresentou maior eficiência de encapsulamento. Essa amostra apresenta maior quantidade de PLA em relação à quitosana e, desta forma, é possível sugerir que a gentamicina tenha se ligado tanto a quitosana quanto ao PLA. Entretanto, estudos mais aprofundados relacionados às interações entre os componentes da formulação devem ser realizados para compreender melhor esse aspecto da síntese.

4.6.1 Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS)

Com o objetivo de confirmar a encapsulação da gentamicina as nanopartículas foi feita a análise de EDS. A utilização de sulfato de gentamicina no preparo das amostras carregadas facilitou essa análise, uma vez que foi possível identificar átomos de enxofre nas nanopartículas. Porém, vale ressaltar que o EDS utilizado tem baixa sensibilidade para identificação de enxofre e por isso a análise foi feita pontualmente (em aglomerados de partículas) para que houvesse uma melhor detecção. Os percentuais mássicos dos principais elementos contidos nas formulações foram apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Percentual mássico dos principais elementos, contido nas nanopartículas sem gentamicina, obtido por EDS.

Após a Filtração				Após a Liofilização			
Amostra	% C	% O	% S	Amostra	% C	% O	% S
1:0,25	15,65	53,69	-	1:0,25	19,15	40,09	-
1:0,50	17,27	44,02	-	1:0,50	36,78	33,29	-
1:0,75	12,23	43,99	-	1:0,75	32,66	35,05	-

Nota: C-Carbono, O-Oxigênio, S-Enxofre, (-) elemento não detectado.

Fonte: Da autora.

Tabela 7 – Percentual mássico dos principais elementos, contido nas nanopartículas carregadas com gentamicina, obtido por EDS.

Após a Filtração				Após a Liofilização			
Amostra	% C	% O	% S	Amostra	% C	% O	% S
1:0,25 + GEN	13,80	39,50	0,63	1:0,25 + GEN	20,80	32,84	1,75
1:0,50 + GEN	9,37	39,61	3,76	1:0,50 + GEN	28,28	41,84	2,32
1:0,75 + GEN	9,79	41,77	4,22	1:0,75 + GEN	24,43	42,60	0,48

Nota: C-Carbono, O-Oxigênio, S-Enxofre.

Fonte: Da autora.

Nas amostras sem o antibiótico não se detectou a presença de enxofre, o que já era esperado.

4.7 LIBERAÇÃO CONTROLADA DE GENTAMICINA *IN VITRO*

Os resultados do ensaio de liberação controlada de gentamicina *in vitro* estão apresentados na Figura 13. Nos gráfico da Figura 13 foi possível observar que a gentamicina teve uma grande concentração liberada nas seis primeiras horas, e que neste período ocorreu uma diluição do meio (Região 1). Isso ocorreu provavelmente porque há gentamicina na superfície da nanopartícula, o que facilita a liberação. Já após 24 horas de liberação a concentração do meio volta a aumentar (Região 2), o que fortalece os indícios de que o antibiótico se ligou também com o PLA que está no núcleo da nanoestrutura “*core-shell*” formada.

Este é um sistema eficiente, uma vez que, nas primeiras horas a gentamicina superficial será liberada ao longo do trajeto pelo organismo e posteriormente terá a etapa lenta de liberação no local afetado pelas bactérias. A interação entre a gentamicina e o PLA forneceu as nanocápsulas um grande potencial de aplicabilidade, pois o fato de a quitosana encapsular o PLA com o antibiótico, fez com que o processo de liberação se prolongasse o que é muito importante para esse tipo de aplicação. Outro ponto interessante é que a quitosana tem características importantes no processo de interação com as células, o que a torna um excelente meio de transporte *in vivo*.

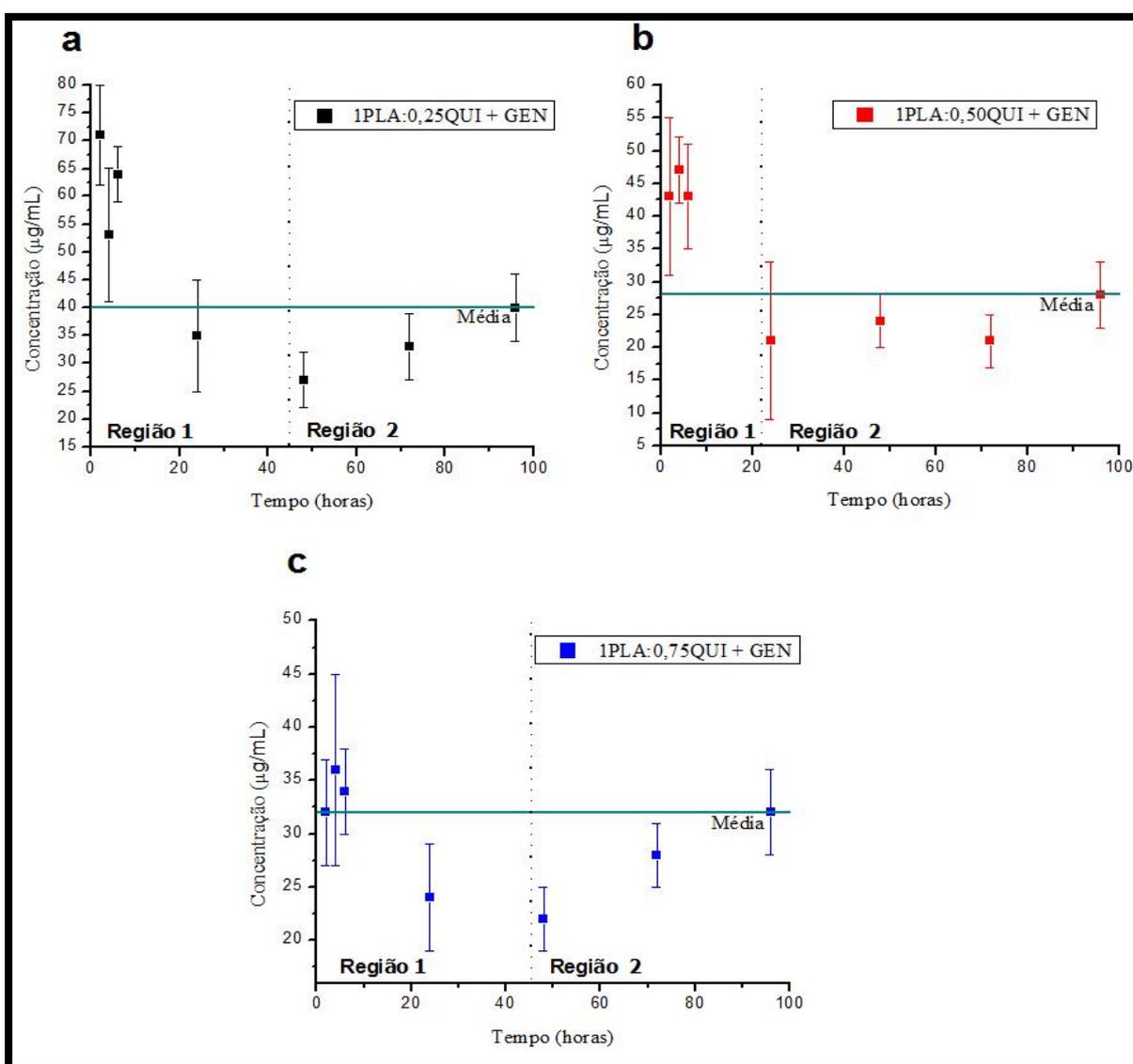


Figura 13 – Perfil de liberação das nanopartículas carregadas com gentamicina no período de 96 horas (a) 1:0,25 (b) 1:0,50 (c) 1:0,75.

Nota: Todas as concentrações devem ser multiplicadas pelo fator de diluição ($f=10$).

Fonte: Da autora.

A amostra de 1:0,25 foi a amostra que apresentou maiores concentrações de gentamicina liberadas e também uma maior média de liberação ao longo das 96 horas. Isso pode ser explicado observando as análises anteriores, uma vez que essa composição foi a que apresentou maior diferença no espectro de FTIR, a banda característica do PLA (1789 cm^{-1}) apresentou-se de forma mais intensa nessa amostra, apontando uma maior retenção desse componente nessa formulação, sendo mais um indicativo de que a gentamicina tenha se ligado também ao PLA.

O cálculo de eficiência também indicou maior incorporação de gentamicina para essa formulação, o que explica essa maior concentração liberada. Macroscopicamente também foi possível observar uma coloração mais amarelada em comparação com as outras composições, que é a coloração característica da gentamicina.

Diante dessas considerações é possível que a gentamicina tenha se ligado tanto aos grupamentos da quitosana quanto do PLA e isso explicaria a maior intensidade da banda de PLA, a maior eficiência de encapsulamento para as nanopartículas que possuíam maior quantidade de PLA em sua composição, e o comportamento observado nos ensaios de liberação *in vitro*.

Uma concentração de gentamicina acima da concentração mínima de inibição (0,5 $\mu\text{g/mL}$ para *Staphylococcus aureus*) (BRITO et al., 2001) sendo liberada nas duas primeiras semanas do período seco seria o ideal, uma vez que após esse período ocorre o processo de formação do tampão de queratina no canal do teto, que funciona como barreira física contra agentes patogênicos. A velocidade de formação do tampão de queratina após secagem é um dos principais fatores de risco para a ocorrência de novas infecções, pois enquanto a barreira de queratina não se forma a glândula fica vulnerável a contaminações (PEREES NETO; ZAPPA, 2011).

Porém mesmo que não se consiga uma liberação tão prolongada como a ideal, uma liberação mais lenta e que supere as aplicações diárias do tratamento convencional (normalmente de 8 em 8 horas) já são interessantes.

4.7.1 Avaliação do Processo de Liberação

A fim de se avaliar o efeito da concentração de gentamicina no meio na liberação do antibiótico foi feita a renovação do volume total do meio, ou seja, após as 96 horas toda solução de PBS foi retirada e uma nova solução foi colocada, esse novo sistema foi colocado

no shaker novamente por mais duas horas e uma nova leitura foi efetuada no UV-Vis. Os cálculos mostraram que praticamente não ocorreu liberação de gentamicina, uma vez que, as absorvâncias das amostras sem gentamicina (branco) foram praticamente iguais às das amostras com gentamicina.

Outra medida realizada consistiu na análise da suspensão de nanopartículas após as 96 horas de liberação. Essa análise foi feita para verificar se toda gentamicina já havia sido liberada ou se havia gentamicina aprisionada às nanopartículas de forma que não pudesse ser liberada facilmente. Desta forma, fez-se a leitura de absorvância das amostras antes e após todo processo de liberação. A Tabela 8 mostra as porcentagens de gentamicina liberadas em todas as amostras após os ensaios de liberação.

Tabela 8 – Gentamicina liberada após 96 horas.

Amostra	Gentamicina residual após 96 horas (%)
1:0,25	92,6
1:0,50	81,8
1:0,75	88,0

Fonte: Da autora.

Os resultados mostraram que praticamente toda gentamicina incorporada havia sido liberada após as 96 horas de ensaio e que a concentração inicial é o principal fator a ser considerado para a determinação das concentrações a serem liberadas.

4.8 ENSAIO MICROBIOLÓGICO

O ensaio antimicrobiano foi feito utilizando-se a suspensão de nanopartículas na mesma concentração que os ensaios de liberação *in vitro* (4mg/mL). Esse ensaio foi realizado a fim de observar se a concentração utilizada na liberação era suficiente para inibir o crescimento da *Staphylococcus aureus* que é a principal bactéria causadora de mastite bovina.

A Figura 14 mostra que as nanopartículas sem gentamicina não inibiram o crescimento da bactéria, enquanto que as nanopartículas carregadas com gentamicina inibiram o crescimento da bactéria, indicando a incorporação do antibiótico às nanopartículas e a viabilidade das nanopartículas em liberar gentamicina.

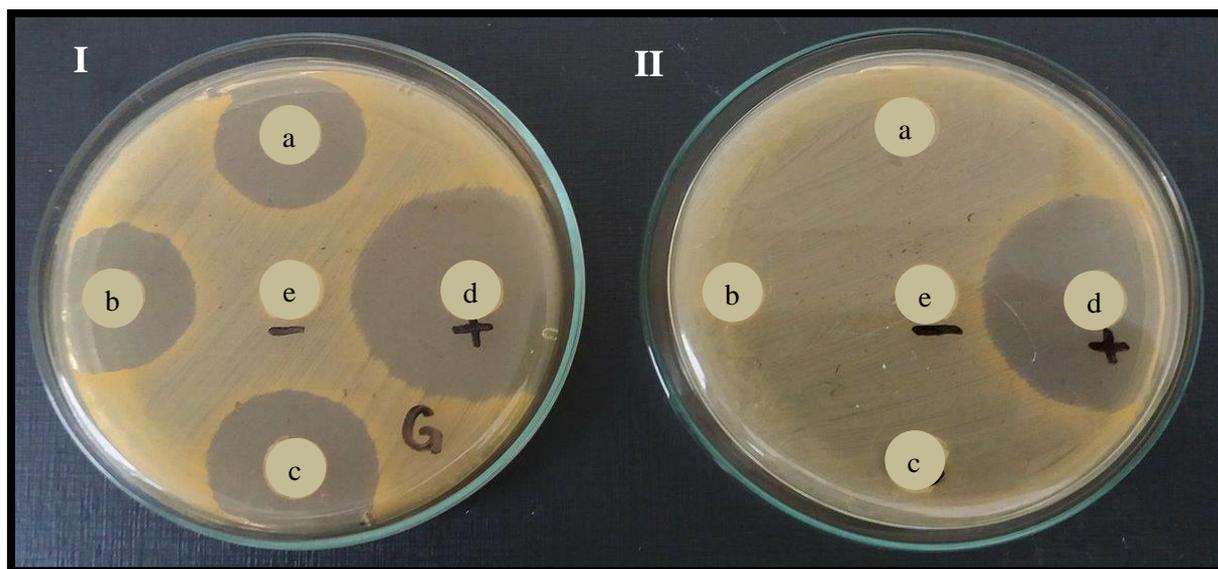


Figura 14 – Resultado da atividade antimicrobiana das nanopartículas nas placas com *Staphylococcus aureus*. I – Amostras carregadas com gentamicina: (a) 1:0,75 (b) 1:0,50 (c) 1:0,25 (d) Controle Positivo (e) Controle Negativo. II – Amostras sem gentamicina: (a) 1:0,75 (b) 1:0,50 (c) 1:0,25 (d) Controle Positivo (e) Controle Negativo.

Fonte: Da autora.

A avaliação dos resultados desse ensaio é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo), e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de microrganismos (OSTROSKY et al., 2008; SPRINGFIELD et al., 2003). De acordo com a dimensão do halo os microrganismos podem ser classificados como: sensíveis, quando o diâmetro da zona de inibição é maior ou não mais do que 3 mm menos que o controle positivo; moderadamente sensíveis, halo maior que 2 mm, mas menor que o controle positivo de mais de 3 mm; e resistentes, diâmetro igual ou menor que 2 mm (OSTROSKY et al., 2008).

Apesar de não ser possível fazer uma comparação com a literatura em relação à dimensão dos halos, uma vez que a concentração de gentamicina (140mg/mL) utilizada no controle positivo foi extremamente maior do que a concentração do antibiótico nas nanopartículas, ainda sim é possível observar a eficiência do sistema. As amostras apresentaram halos em torno de 6 mm, enquanto que o controle positivo apresentou halo de 10 mm, mostrando que a diferença entre os halos só ocorreu devido a diferença de concentração, é possível que as nanopartículas tenha maior eficiência nesse sentido do que o

antibiótico utilizado separadamente, e por isso um ensaio com concentrações iguais deve ser feito.

Este estudo também foi importante para comprovar a viabilidade da utilização de nanopartículas de quitosana/PLA como veículos de liberação de um fármaco hidrofílico, o que ainda não havia sido reportado na literatura.

4.9 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA DE INIBIÇÃO

Atualmente muitos estudos têm sido feitos para se avaliar a susceptibilidade de patógenos causadores de mastite bovina aos diferentes tipos de antimicrobianos, o que tem mostrado um aumento crescente no padrão de resistência, principalmente quando se trata da *Staphylococcus aureus* (BRITO et al., 2001; OLIVEIRA; LANGONI; HULLAND, 2012; SHINABARGER; GOBY, 2014).

A utilização de antimicrobianos para o tratamento da mastite clínica ou da mastite subclínica no início do período seco é um componente importante dos programas de controle, pois esse é um período de grande vulnerabilidade do teto do animal. Nesse sentido a seleção do antimicrobiano apropriado é essencial, tanto do ponto de vista da saúde do animal, quanto da produtividade da glândula mamária (BRITO et al., 2001).

Um dos métodos de se avaliar a susceptibilidade a antimicrobianos é por meio da determinação da concentração mínima inibitória (CMI). Esse método já está padronizado, possui detalhamento técnico bem definido e fornece bons resultados quantitativos (BRITO et al., 2001; OLIVEIRA; LANGONI; HULLAND, 2012; SHINABARGER; GOBY, 2014). Além disso, através desse método é possível confirmar se os ensaios realizados para determinar a eficiência de encapsulamento estão coerentes e se após o encapsulamento do antibiótico às nanopartículas esse medicamento está ou não ativo para ser liberado.

A Figura 15 mostra a placa teste após adição de resazurina sódica a cultura bacteriana, evidenciando que, à medida que a concentração de gentamicina aumenta, a coloração assume tonalidades mais escuras, o que indica inibição do crescimento bacteriano. Os retângulos delimitados em vermelho indicam até onde houve a inibição do crescimento bacteriano.

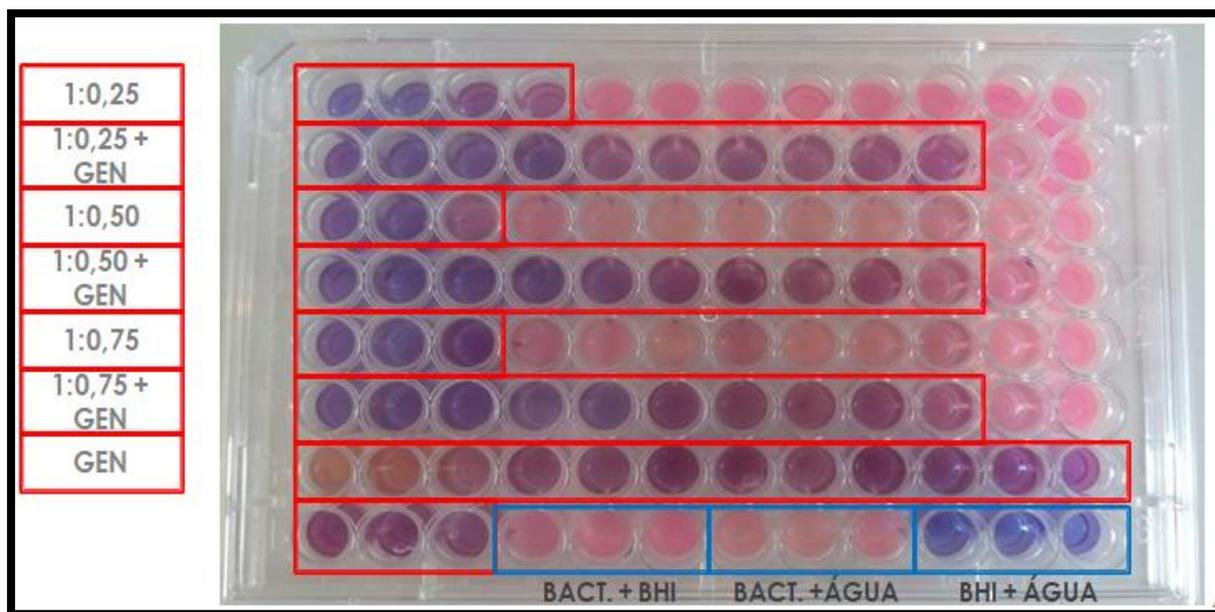


Figura 15 – Placa de 96 poços utilizada no experimento de microdiluição após adição de resazurina para a determinação da concentração mínima inibitória das nanopartículas carregadas com gentamicina sobre as cepas *S. aureus*.

Fonte: Da autora.

As concentrações de gentamicina presentes nas nanopartículas carregadas (Tabela 8) foram calculadas baseando-se nos valores de eficiência apresentados no item 4.6 na Tabela 5.

Tabela 9 – Concentrações de gentamicina presente nas nanopartículas carregadas em cada uma das formulações após as diluições sucessivas.

Concentração de Gentamicina ($\mu\text{g/mL}$)		
1:0,25 + GEN	1:0,50 + GEN	1:0,75 + GEN
677,32	505,51	441,96
338,66	252,75	220,98
169,33	126,38	110,49
84,67	63,19	55,25
42,33	31,59	27,62
21,17	15,80	13,81
10,58	7,90	6,91
5,29	3,95	3,45
2,65	1,97	1,73
1,32	0,99	0,86
0,66	0,49	0,43
0,33	0,25	0,22

Fonte: Da autora.

Na linha em azul da Tabela 9 estão as CMI encontradas para cada uma das formulações, este é um resultado bastante satisfatório quando comparado com a literatura. Brito et al., (2001) em seus estudos de susceptibilidade a antimicrobianos encontrou que a CMI da gentamicina para cepas *S. aureus* foi de 0,5µg/mL o que foi confirmado nos ensaios realizados neste trabalho. A amostra 1:0,25 apresentou uma pequena divergência com a literatura, tendo em vista que a concentração de 0,66µg/mL não inibiu o crescimento da bactéria, porém essa discrepância pode estar associada a erros experimentais, lembrando que os valores de eficiência de encapsulamento foram obtidos através de um método de quantificação indireta.

5 CONCLUSÕES

A técnica utilizada para sintetizar as nanopartículas foi bem-sucedida, tanto no que diz respeito ao tamanho das nanopartícula como na parte de encapsulamento da gentamicina, o que foi bem demonstrado nas análises de MEV com EDS acoplado e DLS.

As micrografias de MEV mostrou que a gentamicina atua não somente como o princípio ativo a ser liberado, mas também tem efeito estrutural na formação das nanopartículas.

Os tamanhos das nanopartículas obtidos após a liofilização são favoráveis à fagocitose pelas células afetadas pelas bactérias, além disso, as partículas apresentaram potencial zeta positivo o que facilita a adesão celular.

A formação de aglomerado tem relação com a estabilidade coloidal da suspensão durante o tempo de armazenamento, assim como a coalescência das partículas. Esse parâmetro é importante quando se deseja uma aplicabilidade industrial e por isso um estudo mais aprofundado nesse aspecto é extremamente importante.

As análises de FTIR realizadas indicaram que houve uma boa interação entre os componentes das formulações.

Nos ensaios de liberação *in vitro* observou-se que em torno de 90% da gentamicina foi liberada no período de 96 horas e que a concentração utilizada para realização do ensaio foi suficiente para inibir o crescimento da *Staphylococcus aureus*. O ensaio de liberação também apresentou um comportamento diferenciado, já que nas primeiras horas houve uma região de diluição e nos últimos dias o dispositivo recomeçou a liberar, o que comprovou mais uma vez que a gentamicina interagiu tanto com PLA quanto com a quitosana e, portanto o princípio ativo foi incorporado na superfície da matriz polimérica formada por quitosana, e também no núcleo oleoso composto por PLA, o que evidenciou a formação de nanopartículas do tipo “*core-shell*”.

A concentração média de gentamicina no meio no período de 96 horas se manteve bem acima da CMI apresentada pela literatura, o que favorece a utilização desse tipo de dispositivo no tratamento da mastite bovina.

O ensaio para se determinar a CMI se mostrou bastante coerente com os valores encontrados na literatura para gentamicina na inibição da *Staphylococcus aureus*, o que mostra que o antibiótico além de ter sido bem incorporado, ele também se encontra de forma disponível para liberação no meio em que as nanopartículas forem inseridas.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a estabilidade coloidal das suspensões;
- Estudar as interações entre a gentamicina e o PLA;
- Variar a concentração de gentamicina;
- Fazer teste *in vivo*;
- Encapsular antibióticos hidrofóbicos.

REFERÊNCIAS

- ABDI, S. I. H. et al. Size-controlled microbeads through the influence of the coalescence effect in the emulsification solvent evaporation method. **Macromolecular Research**, v. 18, n. 7, p. 668–673, 2010.
- AGÊNCIA MINAS GERAIS. **FAPEMIG, EMBRAPA e UFOP desenvolvem nova tecnologia para tratamento da mastite bovina**. 2016. Disponível em: <<http://www.agenciaminas.mg.gov.br/noticia/fapemig-embrapa-e-ufop-desenvolvemnova-tecnologia-para-tratamento-da-mastite-bovina>>. Acesso em: 08 ago. 2016.
- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, p. 5–28, 2004.
- ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 9, n. 11, p. 1035–1052, 2011.
- ALMEIDA, E. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CMI) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arq. Inst. Biol.**, v. 81, n. 3, p. 218–225, 2014.
- ALVES, M. C.; GODOI, L. J.; BUENO, D. A produção de leite como alternativa para melhorar a renda de pequenos produtores rurais: considerações sobre a realidade observada no município de Corumbataí do Sul-PR. In: ENCONTRO DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 5, 2010, Campo Mourão. **Anais...** Campo Mourão: FECILCAM/NUPEM, 2010.
- BELMIRO, D.; MOTA, P. **Preparação e caracterização de micro/nanopartículas de quitosana para liberação de cisplatina**. 2013. 84f. Dissertação (Mestrado em Processos Químicos)—Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, Coimbra, 2013.
- BESHEER, A. et al. Characterization of PLGA nanospheres stabilized with amphiphilic polymers: hydrophobically modified hydroxyethyl starch vs pluronics. **Mol. Pharmaceutics**, v. 6, n. 2, p. 407-415, 2009.
- BOO, G. A. et al. Preparation of gentamicin dioctyl sulfosuccinate loaded poly (trimethylene carbonate) matrices intended for the treatment of orthopaedic infections. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 60, p. 89–98, 2015.
- BRADLEY, A.J.; GREEN, M.J. The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 20, p.547-568, 2004.
- BRITO, M. A. V. P. et al. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 53, n. 5, p. 531–537, 2001.

BULASMED. **Gentamicina**. 2014. Disponível em: <<http://www.bulas.med.br/p/bulas-de-medicamentos/bula/4865/gentamicina.htm>>. Acesso em: 11 ago. 2016.

CARVALHO, F. C. et al. Plataformas Bio (Muco) Adesivas Poliméricas Baseadas em Nanotecnologia para Liberação Controlada de Fármacos - Propriedades , Metodologias e Aplicações. **Polímeros**, v. 24, n. 2, p. 203–213, 2014.

CASTANHEIRA, R. G. **Nanopartículas bioadesivas para administração intramamária: desenvolvimento, caracterização físico-química, cinética de liberação e avaliação biológica *ex vivo***. 2012. 156f. Dissertação (Mestrado em Ciência Farmacêutica)—UFOP, Ouro Preto, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test**; Approved Standard-Tenth Edition. Wayne, CLSI document M02-A10, 2009a.

CHANGEZ, M. et al. Studies on biodegradation and release of gentamicin sulphate from interpenetrating network hydrogels based on poly (acrylic acid) and gelatin : in vitro and in vivo. **Biomaterials**, v. 25, p. 139–146, 2004.

CHIENG, B. W. et al. Poly(lactic acid)/poly(ethylene glycol) polymer nanocomposites: effects of graphene nanoplatelets. **Polymers**, v. 6, n. 1, p. 93-104, 2013.

CHINH, N. T. et al. Thermal property, morphology, and hydrolysis ability of poly (lactic acid)/ chitosan nanocomposites using polyethylene oxide. **Journal of Applied Polymer Science**, p. 6–11, 2015.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e caracterização de sistemas de libertação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural**. 2010. 268f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)—Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

DANTAS, C.C.O.; SILVA, L.C.R.P.; NEGRÃO, F.M. Manejo sanitário de doenças do gado leiteiro. **PUBVET**, Londrina, v. 4, n. 32, Ed. 137, Art. 928, 2010.

DEV, A. et al. Preparation of poly(lactic acid)/chitosan nanoparticles for anti-HIV drug delivery applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 833–838, 2010.

DIAS, K. B. et al. Chitin and chitosan: characteristics, uses and production current perspectives. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, p. 184–191, 2013.

DU, T. et al. Modification of collagen–chitosan matrix by the natural crosslinker alginate dialdehyde. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1-9, 2015.

DURR, J. W. **Como produzir leite de qualidade**. 4. ed. Brasília: SENAR, 2012.

DORATI, R. et al. Characterization and delivery of a model protein. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n. 5, p. 330–338, 2008.

EMBRAPA GADO DE LEITE. Nanotecnologia no tratamento da mastite. **Rev. Mundo do leite**, 2016.

- FAN, J. et al. Preliminary treatment of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, with trx-SA1, recombinant endolysin of *S. aureus* bacteriophage. **Veterinary Microbiology**, v. 191, p. 65–71, 2016.
- FREITAS, M. F. L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *staphylococcus coagulase* positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de pernambuco. **Arq. Inst. Biol.**, v. 72, n. 2, p. 171–177, 2005.
- FRIEDMAN, M. Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 385–406, 2004.
- FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 558–566, 2004.
- FRUTOS, G.; BARRALES-RIENDA, J. M. Release of gentamicin sulphate from a modified commercial bone cement. Effect of (2-hydroxyethyl methacrylate) comonomer and poly (N - vinyl-2-pyrrolidone) additive on release mechanism and kinetics. **Biomaterials**, v. 23, p. 3787–3797, 2002.
- FRUTOS, P. et al. A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, p. 1149–1159, 2000.
- GIBELLI, I. C. **Ação antibacteriana de nanopartículas de prata em poli (ácido láctico) – PLA e estudo da biodegradação.** 2012. 62f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)—UFSCar, São Carlos, 2012.
- GRUET, P. et al. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, n. 3, p. 245–259, 2001.
- GUERRERO, D. Q. et al. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n.12, p. 1113-1128, 1998.
- GUTERRES, S. S. et al. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, p. 57–63, 1995.
- HE, C. et al. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3657–3666, 2010.
- HOIDY, W. H. et al. Preparation and characterization of polylactic acid/polycaprolactone clay nanocomposites. **Journal of Applied Sciences**, v. 10, n. 2, p. 97–106, 2010.
- HU, Y. et al. Synthesis and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles. **Biomaterials**, v. 23, n. 15, p. 3193–3201, 2002.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal**, v. 43, p. 1-49, 2015.

JEEVITHA, D.; AMARNATH, K. Chitosan/PLA nanoparticles as a novel carrier for the delivery of anthraquinone: Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 126–134, 2013.

JONES, C. F.; GRAINGER, D. W. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 6, p. 438–456, 2009.

JOSUÉ, A. et al. Liberação controlada da eosina impregnada em microesferas decopolímero de quitosana e poli(ácido acrílico). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 10, p. 116–121, 2000.

JUNGINGER, H. E.; VERHOEF, J. C. Macromolecules as safe penetration enhancers for hydrophilic drugs - A fiction? **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 1, n. 9, p. 370–376, 1998.

KANAKUBO, Y.; ITO, F.; MURAKAMI Y. Novel one-pot facile technique for preparing nanoparticles modified with hydrophilic polymers on the surface via block polymer-assisted emulsification/evaporation process. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 78, n. 1, p. 85-91, 2010.

KISS, J. **Nanotecnologia avança no campo brasileiro**. São Paulo, 2012. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/unicamp/clipping/2012/06/22/nanotecnologia-avanca-no-campo-brasileiro>>. Acesso em: 20 mai. 2016.

KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Cienc. Cult.**, v. 65, n. 3, p. 28–31, 2013.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1–27, 2000.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1–18, 2010.

LEE, J. S. et al. Protein-stabilized nanoemulsions and emulsions: comparison of physicochemical stability, lipid oxidation, and lipase digestibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 415–427, 2011.

LEE, S. J.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/ evaporation approach. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 6-7, p. 560–569, 2010.

LEGRAND, P. et al. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, n. 1-2, p. 33-43, 2007.

LEMOS-SENNA, E. et al. Preparation of amphiphilic cyclodextrin nanospheres using the emulsification solvent evaporation method. Influence of the surfactant on preparation and hydrophobic drug loading. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 170, p. 119–128, 1998.

- LIU, P. et al. Use of nanoparticles as therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Current Drug Metabolism**, p. 875–884, 2009.
- LYRA, M. A. M. DE; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO, M. T. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 784–93, 2007.
- MAINARDES, R. M. **Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina**. 2007. 133f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)—UNESP, Araraquara, 2007.
- MARQUES, V. et al. Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1–7, 2016.
- MCCLEMENTS, D. J. Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.**, v. 1, p. 241–269, 2010.
- MEKONNEN, T. et al. Progress in bio-based plastics and plasticizing modifications. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 1, n. 43, p. 13379, 2013.
- MENG, J.; STURGIS, T. F.; YOUAN, B.-B. C. Engineering tenofovir loaded chitosan nanoparticles to maximize microbicide mucoadhesion. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 1-2, p. 57–67, 2011.
- MISRA, B. R. D. K. et al. Hybrid Nanoscale architecture for enhancement of antimicrobial activity: immobilization of silver nanoparticles on thiol-functionalized polymer crystallized on carbon nanotubes. **Advanced Engineering Materials**, n. 4, p. 93–100, 2012.
- MOHAMMADI, G. et al. Development of azithromycin–PLGA nanoparticles: physicochemical characterization and antibacterial effect against *Salmonella typhi*. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 80, n. 1, p. 34–39, 2010.
- MOLPECERES, J. et al. Freeze-drying of polycaprolactone and poly (d,l-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. **International Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 379–387, 2000.
- OLIVEIRA, E. J. et al. Ocorrência da mastite clínica e fatores ambientais que favorecem sua incidência 1. **B. Industr. Anim.**, v. 70, n. 2, p. 132–139, 2013.
- OLIVEIRA, L.; LANGONI, H.; HULLAND, C. Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 4, p. 1913–1920, 2012.
- OSTROSKY, E. A. et al. Divulgação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.
- PEREES NETO, F.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras - revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 16, p. 19–44, 2011.

- PERUGINI, P. et al. Evaluation of enzyme stability during preparation of polylactide-co-glycolide microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 5, p. 591–603, 2002.
- POOJA, D. et al. Optimization of solid lipid nanoparticles prepared by a single emulsification-solvent evaporation method. **Data in Brief**, v. 6, p. 15–19, 2016.
- RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 887-913, 2011.
- RASPANTI, C. G. et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine subclinical mastitis in dairy herds in the central region of Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 48, n. 1, p. 50–56, 2016.
- REZENDE, S. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.
- SANTOS, L. G. **Obtenção de nanofibras eletrofiadas de poli (L-ácido láctico) – PLLA incorporadas com *Sedum dendroideum* no reparo de lesões cutâneas**. 2014. 111f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)—UNICAMP, Campinas, 2014.
- SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1–20, 2001.
- SPRINGFIELD, E. P. et al. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine**, v. 10, p. 434–439, 2003.
- TEO, A. et al. Physicochemical properties of whey protein, lactoferrin and tween 20 stabilised nanoemulsions: effect of temperature, pH and salt. **Food Chemistry**, v. 197, p. 297–306, 2016.
- TEO, A. et al. Kinetic stability and cellular uptake of lutein in WPI-stabilised nanoemulsions and emulsions prepared by emulsification and solvent evaporation method. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1269–1276, 2017.
- THI, T. et al. Coaxial electrospun poly (lactic acid)/ chitosan (core/shell) composite nanofibers and their antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 4, p. 1799–1806, 2011.
- VANGROENWEGHE, F.; LAMOTE, I.; BURVENICH, C. Physiology of the periparturient period and its relation to severity of clinical mastitis. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 283–293, 2005.
- VAUTHIER, C. et al. Poly (alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 519–548, 2003.
- VILELA, D. **Controle de Mastite**, 2011. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/sistemaproducao/410216-controle-de-mastite>>. Acesso em: 19 set. 2015

VIRTO, M. R. et al. Gentamicin release from modified acrylic bone cements with lactose and hydroxypropylmethylcellulose. **Biomaterials**, v. 24, p. 79–87, 2003.

WAN, Y. et al. Biodegradable polylactide/chitosan blend membranes. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 1362–1372, 2006.

WANG, W. et al. Poly(lactic acid)/chitosan hybrid nanoparticles for controlled release of anticancer drug. **Materials Science and Engineering: C**, v. 46, p. 514–520, 2015.

WATSON, P.; JONES, A. T.; STEPHENS, D. J. Intracellular trafficking pathways and drug delivery: fluorescence imaging of living and fixed cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 43–61, 2005.

WERS, E. et al. Evaluation of the kinetic and relaxation time of gentamicin sulfate released from hybrid biomaterial Bioglass-chitosan scaffolds. **Applied Surface Science**, v. 353, p. 200–208, 2015.

XIAO, K. et al. The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholic acid based micellar nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 13, p. 3435–3446, 2011.

YIN, W. et al. Fluorescent quantum dot - polymer nanocomposite particles by emulsification/solvent evaporation. **Chem. Mater.**, v. 19, n. 12, p. 2930–2936, 2007.

YUAN, X. B. et al. Preparation of rapamycin-loaded chitosan/PLA nanoparticles for immunosuppression in corneal transplantation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, n. 1-2, p. 241–248, 2008.

YUNHE, F. et al. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* elicit different innate immune responses from bovine mammary epithelial cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 155, n. 4, p. 245–252, 2013.

ZHANG, S. F. et al. Preparation and physicochemical characteristics of polylactide microspheres of emamectin benzoate by modified solvent evaporation/extraction method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 12219–12225, 2013