



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

ANNY LETÍCIA MARINHO RAMOS CARDOSO

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO
ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.) PARA
TRATAMENTO DE MASTITE DO GADO LEITEIRO**

JOÃO PESSOA,
2025

ANNY LETÍCIA MARINHO RAMOS

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.) PARA TRATAMENTO DE
MASTITE DO GADO LEITEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de concentração: Farmacoquímica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior

Coorientadora: Prof. Dr^a Kataryne Árabe Rimá de Oliveira

JOÃO PESSOA,
2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C268c Cardoso, Anny Letícia Marinho Ramos.

Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo óleo essencial de orégano (Origanum vulgare L.) para tratamento de mastite do gado leiteiro / Anny Letícia Marinho Ramos Cardoso. - João Pessoa, 2025.

127 f. : il.

Orientação: Francisco Humberto Xavier Júnior. Coorientação:
Kataryne Árabe Rimá de Oliveira. Dissertação (Mestrado) -
UFPB/CCS.

1. Origanum vulgare L. - Produtos naturais. 2. Óleo essencial de orégano -
Terapêutica. 3. Doença inflamatória intramamária. 4. Nanobiotecnologia. 5.
Staphylococcus aureus. I. Xavier Júnior, Francisco Humberto. II. Oliveira,
Kataryne Árabe Rimá de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 635.71(043)

**CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.) PARA TRATAMENTO DE
MASTITE DO GADO LEITEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós- Graduação em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos da Universidade
Federal da Paraíba, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de concentração: Farmacoquímica

Aprovada em: 26/02/2025

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 FRANCISCO HUMBERTO XAVIER JÚNIOR
Data: 27/02/2025 09:45:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior (Orientador)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Documento assinado digitalmente
 KATARYNE ARABE RIMA DE OLIVEIRA
Data: 27/02/2025 10:12:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr^a. Kataryne Árabe Rimá de Oliveira (Coorientadora)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Documento assinado digitalmente
 ELQUIO ELEAMEN OLIVEIRA
Data: 27/02/2025 16:54:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira (Membro Titular Externo)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Documento assinado digitalmente
 YURI MANGUEIRA DO NASCIMENTO
Data: 27/02/2025 10:58:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Yuri Mangueira do Nascimento (Membro Titular Interno)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Dedico à minha família e ao meu amor, em especial à minha avó Josefa Marinho Ramos, responsável por me dar forças e todo apoio para seguir!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu alicerce em meio ao caos e minha esperança em meio ao desespero. À Nossa Senhora de Fátima, minha maior intercessora!

À minha avó, Josefa, por todo o apoio, dedicação e sacrifício ao longo da minha vida. Aos meus avôs, Carlos e Heriberto, dedicado o árduo caminho até aqui!

Agradeço aos meus pais, Emanuela e Delon, por todo o apoio e amparo que me forneceram até aqui. Vocês são meu alicerce e meus maiores tesouros! À minha irmã, por sua bondade e por sempre me apoiar em tudo!

À minha tia Dani, por todo dia me mostrar o sinônimo de força, resiliência e fé! Você me ensina todos os dias! Obrigada por tanto!

Ao amor da minha vida e meu namorado, Lucas, por ser meu maior apoio, defensor, conselheiro e confidente! Obrigada por ser exatamente quem você é e por complementar a minha vida! Eu te amo além dessa e de outras vidas, para sempre!

À Universidade Federal da Paraíba, ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) e a todos os professores, por toda base de conhecimento técnico-científico que fundamentou minha formação.

Aos órgãos de fomento que me proporcionaram a realização desta pesquisa: Capes, CNPq e Fapesq.

À minha banca examinadora, composta pelos Professores Dr. Elquio Eleamen Oliveira e Dr. Yuri Manguiera do Nascimento, por suas contribuições e dedicação no aperfeiçoamento deste projeto.

Às minhas amigas de escola, Helade e Laís, obrigada por serem únicas!

Aos amigos que fiz ao longo jornada acadêmica na graduação, em especial à Fellipe, Lindomara, Shayenne, Luquinhas, Anne, Mateus, Vitor e Matheus, obrigada pelo impacto que vocês tiveram nas minhas escolhas acadêmicas. Ter vivido cada momento com vocês na graduação foi incrível. Sinto muitas saudades de vocês!

Aos amigos da pós-graduação, Allessya, Flavinha, Pedro, Medeiros, Grazi, Álisson e Bea que vieram para somar e enriquecer minha vida. Vocês são amigos para a vida! Os amo demais. É um privilégio dividir meus dias com vocês, entre cafés e muitas conversas na salinha!

Aos “meus alunos de iniciação científica”, Bárbara, João, Cecília e Eduardo, por todos os momentos compartilhados. Agradeço imensamente a honra de trabalhar com vocês!

Aos amigos e colaboradores que fiz, em especial à Itallo, Bruna, Rafealla, Jaielson e Karina, obrigada por todo apoio e dedicação!

À todos que compõem o Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica (BioTecFarm) e Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (LMBA) por todo suporte técnico. Meus agradecimentos também aos laboratórios parceiros, Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) e ao Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos (NCQMC - LAMP), pela contribuição especial nessa pesquisa.

Ao Professor Dr. Artur Cezar de Carvalho Fernandes, por gentilmente ter contribuído no fornecimento das cepas bacterianas isoladas de animais com mastite bovina e por toda à disponibilidade que nos foi dada.

À minha coorientadora, Kataryne Árabe Rimá de Oliveira, gostaria de agradecer por pegar na minha mão e me guiar no universo na Microbiologia. Por toda palavra, incentivo e compreensão. Por ter aceitado correr comigo contra o tempo nesta jornada! Obrigada por absolutamente tudo! A senhora é incrível!

E um agradecimento especial ao meu orientador, Francisco Humberto Xavier Júnior, por ter me acolhido no laboratório e ser como um pai para mim e todos os demais! O senhor é nossa inspiração! É uma honra ter um pesquisador e orientador do seu nível, raros são os que pegam na mão e trilham a caminhada com você. O senhor, além de orientador, se tornou um amigo e um pai! Obrigada por todos os ensinamentos, momentos e dedicação!

Por fim, agradeço à minha estrela e anjo da guarda, minha vózinha Giusa de Moura Cardoso, por ser minha base, inspiração e maior saudade! Àquela que me dá forças todos os dias. Gostaria muito que você estivesse aqui. Te amo!

“Entre a vida e a morte, há uma biblioteca. E dentro dessa biblioteca, as prateleiras não têm fim.

Cada livro oferece uma oportunidade de experimentar outra vida que você poderia ter vivido. De ver como as coisas seriam se tivesse feito outras escolhas... Você teria feito algo diferente, se houvesse a chance de desfazer tudo de que se arrepende?”

(A Biblioteca da Meia-Noite)

RESUMO

A mastite bovina representa um desafio significativo para a pecuária leiteira, causando prejuízos substanciais à produção. Nesse contexto, torna-se imprescindível a busca por novas estratégias terapêuticas que aliem eficácia antimicrobiana à segurança biológica. A espécie *Origanum vulgare* L. (orégano) tem sido amplamente investigada devido ao seu potencial antimicrobiano, atribuído à presença de monoterpenoides, como timol e carvacrol. Entretanto, limitações relacionadas às suas propriedades físico-químicas têm despertado o interesse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de sistemas que possam otimizar sua aplicação. Nesse sentido, os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) apresentam-se como sistemas nanotecnológicos inovadores e promissores para o tratamento de diversas patologias, incluindo a mastite bovina. O objetivo deste trabalho foi desenvolver, otimizar e caracterizar nanossistemas funcionalizados do tipo CLNs contendo óleo essencial de orégano (OEO) para aplicação antioxidante e antimicrobiana visando o tratamento de mastite do gado leiteiro. O óleo essencial de orégano foi caracterizado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), evidenciando o carvacrol (70,1%) como composto majoritário. Os CLNs foram produzidos pela técnica de emulsificação a quente seguida de sonicação, utilizando cera de abelha como lipídio sólido e Span® 60 e Tween® 80 como os surfactantes lipofílico e hidrofílico, respectivamente, em amplitude de 80% durante 30 segundos. A formulação inicial apresentou estabilidade macroscópica, com tamanho de partícula de $211,3 \pm 1,9$ nm; índice de polidispersão (PdI) $0,22 \pm 0,01$ e potencial Zeta (PZ) $-37,5 \pm 1,1$ mV. Para otimizar o sistema, foi realizado um planejamento fatorial do tipo *Box-benhken*, gerando 15 formulações com três repetições no ponto central. As formulações otimizadas compostas por cera de abelha (1%), OEO (1%), Span® 60 (2%) e Tween® 80 (3%) apresentaram tamanho de partícula de $138,1 \pm 3,2$ nm; PdI de $0,15 \pm 0,01$ e PZ de $-25,7 \pm 1,0$ mV. Os carreadores foram funcionalizados com polietilenoglicol (PEG) (0,2%), colesterol (0,2%) e Pluronic® F-68 (0,5%) resultando em partículas com tamanhos de $94,7 \pm 1,9$; $114,2 \pm 0,7$ e $69,3 \pm 1,2$ nm, PdI de $0,24 \pm 0,01$; $0,25 \pm 0,02$ e $0,26 \pm 0,01$ e PZ de $-4,3 \pm 0,2$; $-28,2 \pm 0,7$ e $-28,4 \pm 2,0$ mV, respectivamente. A estabilidade físico-química das formulações foi monitorada por 60 dias nas temperaturas 4, 25 e 37 °C, indicando estabilidade no decorrer do tempo, exceto para a formulação funcionalizada com PEG à 37 °C. Os CLNs foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), difração de raio-X (DRX), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria diferencial exploratória (DSC), sugerindo dispersão do óleo essencial na matriz lipídica da cera de abelha. A eficiência de encapsulação para todas as formulações foi acima de 97%, com destaque para oCLN-Col (99,9%). A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP, indicando um perfil antioxidante significativo para todas as formulações, sendo mais proeminente nos CLNs otimizados (oCLN). As formulações foram submetidas a testes antimicrobianos, incluindo determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e curva de morte celular. Todas as formulações demonstram atividade antimicrobiana contra diferentes cepas de bactérias patogênicas associadas à mastite bovina, com destaque para oCLN, que apresentou CIM de 1,92 mg/mL e redução logarítmica superior a 3 log na curva de morte (T0: $8,28 \pm 0,16$ para T4: $5,66 \pm 0,07$ UFC/mL). Portanto, os sistemas desenvolvidos apresentaram dimensões nanométricas e funcionalidade adequada, evidenciando a viabilidade da formulação otimizada na aplicação terapêutica. Dessa forma, os CLNs contendo OEO configuram-se como uma abordagem promissora no tratamento da mastite bovina, demonstrando potencial significativo para aplicações futuras na medicina veterinária.

Palavras-Chave: Nanobiotecnologia; Produtos Naturais; Lipídios; Doença Inflamatória Intramamária. *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Bovine mastitis represents a significant challenge for dairy farming, causing substantial losses to production. In this context, the search for new therapeutic strategies that combine antimicrobial efficacy with biological safety becomes essential. The species *Origanum vulgare* L. (oregano) has been widely investigated due to its antimicrobial potential, attributed to the presence of monoterpenoids, such as thymol and carvacrol. However, limitations related to its physicochemical properties have aroused the interest of the pharmaceutical industry in the development of systems that can optimize its application. In this sense, nanostructured lipid carriers (NLCs) present themselves as innovative and promising nanotechnological systems for the treatment of several pathologies, including bovine mastitis. The aim of this study was to develop, optimize and characterize functionalized nanosystems of the NLC type containing oregano essential oil (OEO) for antioxidant and antimicrobial application in the treatment of mastitis in dairy cattle. The oregano essential oil was characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), evidencing carvacrol (70.1%) as the major compound. The NLCs were produced by the hot emulsification technique followed by sonication, using beeswax as the solid lipid and Span® 60 and Tween® 80 as the lipophilic and hydrophilic surfactants, respectively, at an amplitude of 80% for 30 seconds. The initial formulation showed macroscopic stability, with a particle size of 211.3 ± 1.9 nm; polydispersity index (Pdl) 0.22 ± 0.01 and Zeta potential (PZ) -37.5 ± 1.1 mV. To optimize the system, a *Box-Benhken* factorial design was performed, generating 15 formulations with three replicates at the central point. The optimized formulations composed of beeswax (1%), OEO (1%), Span® 60 (2%) and Tween® 80 (3%) presented a particle size of 138.1 ± 3.2 nm; Pdl of 0.15 ± 0.01 and PZ of -25.7 ± 1.0 mV. The carriers were functionalized with polyethylene glycol (PEG) (0.2%), cholesterol (0.2%) and Pluronic® F-68 (0.5%) resulting in particles with sizes of 94.7 ± 1.9 ; 114.2 ± 0.7 and 69.3 ± 1.2 nm, Pdl of 0.24 ± 0.01 ; 0.25 ± 0.02 and 0.26 ± 0.01 and PZ of -4.3 ± 0.2 ; -28.2 ± 0.7 and -28.4 ± 2.0 mV, respectively. The physicochemical stability of the formulations was monitored for 60 days at temperatures of 4, 25 and 37 °C, indicating stability over time, except for the PEG-functionalized formulation at 37 °C. The NLCs were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC), suggesting dispersion of the essential oil in the beeswax lipid matrix. The encapsulation efficiency for all formulations was above 97%, with emphasis on oNLC-Col (99.9%). The antioxidant activity was evaluated by the ABTS, DPPH and FRAP methods, indicating a significant antioxidant profile for all formulations, being more prominent in the optimized NLCs (oNLC). The formulations were subjected to antimicrobial tests, including determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and cell death curve. All formulations demonstrated antimicrobial activity against different strains of pathogenic bacteria associated with bovine mastitis, with emphasis on oNLC, which presented a MIC of 1.92 mg/mL and a logarithmic reduction greater than 3 log in the death curve (T0: 8.28 ± 0.16 to T4: 5.66 ± 0.07 CFU/mL). Therefore, the developed systems presented nanometric dimensions and adequate functionality, evidencing the viability of the optimized formulation in therapeutic application. Thus, NLCs containing OEO appear to be a promising approach in the treatment of bovine mastitis, demonstrating significant potential for future applications in veterinary medicine.

Keywords: Nanobiotechnology; Natural Products; Lipids; Intramammary Inflammatory Disease. *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais causas de acometimento da mastite bovina em vacas leiteiras.....	23
Figura 2. Monoterpenos fenólicos carvacrol (A) e timol (B), compostos majoritários do óleo essencial de orégano.....	29
Figura 3. Estrutura dos sistemas nanotecnológicos de destaque para aplicação terapêutica....	32
Figura 4. Estrutura de um Carreador Lipídico Nanoestruturado (CLN).....	34
Figura 5. Exemplos de componentes utilizados na modificação da superfície dos CLNs.....	37
Figura 6. Representação esquemática do processo de produção dos CLNs.....	46
Figura 7. Cromatograma do óleo de orégano.....	56
Figura 8. Efeito da variação do tempo de sonicação nos parâmetros de tamanho das partículas (nm) (A), índice de polidispersão (B) e potencial Zeta (mV) (C).....	65
Figura 9. Efeito da variação da amplitude de sonicação nos parâmetros de tamanho das partículas (nm) (A), índice de polidispersão (B) e potencial Zeta (mV) (C).....	66
Figura 10. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis independentes conforme os resultados de tamanho das partículas.....	70
Figura 11. Médias marginais e limites de confiabilidade das variáveis independentes usadas no planejamento experimental conforme os resultados de tamanho das partículas.....	72
Figura 12. Gráficos de superfície de resposta gerados através do planejamento experimental por meio do software Statistica® mediante os resultados de tamanho das partículas.....	73
Figura 13. Gráficos dos perfis para valores previstos e desejabilidade obtidos através do planejamento experimental de acordo com os resultados de tamanho das partículas.....	75
Figura 14. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis independentes conforme os resultados da carga de superfície das partículas.....	76
Figura 15. Médias marginais e limites de confiabilidade das variáveis independentes usadas no planejamento experimental conforme os resultados da carga de superfície das partículas.....	77
Figura 16. Gráficos dos perfis para valores previstos e desejabilidade obtidos através do planejamento experimental de acordo com os resultados da carga de superfície das partículas.....	78
Figura 17. Gráficos dos perfis para valores previstos e desejabilidade obtidos através do planejamento experimental de acordo com os resultados de tamanho e da carga de superfície das partículas.....	79
Figura 18. Impacto das concentrações dos componentes funcionalizantes no tamanho médio das partículas (A), índice de polidispersão (B) e potencial Zeta (C) na produção dos	

carreadores.....	81
Figura 19. Comparação do tamanho de partícula (A), índice de polidispersão (B) e potencial Zeta (C) das formulações funcionalizadas selecionadas.....	83
Figura 20. Espectros de FTIR dos componentes utilizados na produção dos CLNs otimizados e funcionalizados.....	87
Figura 21. Espectros de FTIR dos CLNs otimizados e funcionalizados.....	88
Figura 22. Imagens da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos carreadores lipídicos nanoestruturados otimizado e funcionalizados em diferentes escalas.....	89
Figura 23. Espectros de Difração de Raio-X (DRX) dos compostos isolados e das formulações otimizada e funcionalizadas.....	90
Figura 24. Análises TGA (A) e DSC (B) dos CLNs.....	91
Figura 25. Cromatograma do óleo essencial de orégano por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	93
Figura 26. Curva de calibração do óleo essencial de orégano.....	93
Figura 27. Estudo de estabilidade dos CLNs quando submetidos a temperatura de geladeira (4 °C) (A) conforme resultados de análise de tamanho (nm), PdI e potencial Zeta (mV).....	96
Figura 28. Estudo de estabilidade dos CLNs quando submetidos a temperatura de bancada (25 °C) (B) conforme resultados de análise de tamanho (nm), PdI e potencial Zeta (mV).....	97
Figura 29. Estudo de estabilidade dos CLNs quando submetidos a temperatura de estufa (37 °C) (C) conforme resultados de análise de tamanho (nm), PdI e potencial Zeta (mV).....	98
Figura 30. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de orégano e das formulações otimizada e funcionalizadas frente às linhagens bacterianas <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus coagulase-negativa</i> e <i>Escherichia coli</i>	103
Figura 31. Contagem de células viáveis de <i>Staphylococcus aureus</i> 700 (a) e <i>Escherichia coli</i> 843 (b) em função da exposição a carreadores lipídicos nanoestruturados otimizado e funcionalizados com óleo essencial de orégano.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes encontrados no óleo de orégano por CG-EM: Identificação do pico, tempo de retenção (min), porcentagem relativa a área e a relação massa carga (m/z).....	57
Tabela 2. Resultados da caracterização físico-química dos carreadores mediante a variação de lipídio sólido.....	59
Tabela 3. Resultados da caracterização físico-química dos carreadores mediante a variação dos tensoativos lipofílicos e hidrofílicos.....	62
Tabela 4. Planejamento experimental do tipo <i>Box-Behnken</i> para otimização dos carreadores lipídicos com diferentes concentrações de lipídios e tensoativo hidrofílico.....	68
Tabela 5. Otimização das formulações obtidas de acordo com o planejamento experimental do tipo <i>Box-Behnken</i>	79
Tabela 6. Doseamento e Eficiência de Encapsulação dos nanossistemas otimizados e funcionalizados.....	94
Tabela 7. Capacidade antioxidante dos nanossistemas lipídicos otimizados e funcionalizados contendo óleo essencial de orégano.....	102
Tabela 8. Contagem de células viáveis de <i>Staphylococcus aureus</i> 700 após tempo de exposição de 48h a carreadores lipídicos nanoestruturados otimizado e funcionalizados com óleo de orégano.....	107
Tabela 9. Contagem de células viáveis de <i>Escherichia coli</i> 843 após tempo de exposição de 48h a carreadores lipídicos nanoestruturados otimizado e funcionalizados com óleo de orégano.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS - Ácido 2,2-azino-bis(3- etilbenzoatiazolina)-6-sulfônico)

BHI – *Brain Heart Infusion*

CA – Cera de Abelha

CIM - Concentração inibitória mínima

CLN - Carreador Lipídico Nanoestruturado

CSCs - Contagem de células somáticas

DPPH• - (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

DRX – Difração de Raio-X

DSC - Calorimetria exploratória diferencial

FRAP - Poder antioxidante redutor férrico

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

CG-EM - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

MECs - Células epiteliais mamárias

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

mV – milivolts

nm – nanômetros

NLS – Nanopartícula lipídica sólida

oCLN – Carreador lipídico nanoestruturado otimizado

oCLN-Col – Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com colesterol

oCLN-PEG – Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com polietilenoglicol

oCLN-Plu – Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com Pluronic® F-68

OEO – Óleo essencial de Orégano

PdI – Índice de polidispersão

PEG – Polietilenoglicol

PZ – Potencial Zeta

RAM – Resistência Antimicrobiana

T80 – Tween® 80

TGA – Análise termogravimétrica

TPTZ - (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina)

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 PRODUTOS LÁCTEOS.....	21
2.2 MASTITE BOVINA	22
2.3 PATOGENIA	24
2.4 ANTIBIOTICOTERAPIA	26
2.5 PRODUTOS NATURAIS.....	27
2.6 ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO.....	29
2.7 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA	30
2.7.1 Lipossomas	32
2.7.2 Nanopartículas poliméricas	33
2.7.3 Nanopartículas inorgânicas	33
2.7.4 Carreadores lipídicos nanoestruturados	34
2.8 NANOTECNOLOGIA APLICADA NO TRATAMENTO DA MASTITE	37
3. OBJETIVOS.....	42
3.1 OBJETIVO GERAL	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 MATERIAIS	44
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO	44
4.3 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS.....	44
4.3.1 Efeito de Composição	44
4.3.2 Efeito do Processo de Produção.....	45
4.4 PRODUÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PELO MÉTODO DE EMULSIFICAÇÃO A QUENTE SEGUIDO DE SONICAÇÃO.....	45
4.5 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO EXPERIMENTAL DO TIPO BOX-BEHNKEN.....	46
4.6 OTIMIZAÇÃO DOS NANOSSISTEMAS PRODUZIDOS CONFORME BOX-BEHNKEN..	47
4.7 FUNCIONALIZAÇÃO DO NANOSSISTEMA OTIMIZADO.....	47
4.8 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	47
4.8.1 Análise do tamanho de partícula	47
4.8.2 Potencial Zeta.....	48
4.8.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	48
4.8.4 Análise Morfológica: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	48
4.8.5 Análise de Difração de Raio-X (DRX)	49
4.8.6 Análises Térmicas.....	49
4.9 DOSEAMENTO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE%)	49
4.10 ESTUDO DE ESTABILIDADE DOS NANOSSISTEMAS	50

4.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO.....	50
4.11.1 Capacidade antioxidante <i>in vitro</i> – método DPPH	50
4.11.2 Capacidade antioxidante <i>in vitro</i> – método FRAP.....	51
4.11.3 Capacidade antioxidante <i>in vitro</i> - Método ABTS• ⁺	51
4.11 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO ..	52
4.12 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	53
4.13 CINÉTICA DE CRESCIMENTO.....	53
4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO	56
5.2 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO.....	58
5.2.1 Efeito dos Lipídios Sólidos na composição dos CLNs.....	58
5.2.2 Efeitos dos tensoativos na composição dos CLNs	61
5.3 EFEITO DOS PARÂMETROS DE PRODUÇÃO DOS CLNS	64
5.3.1 Tempo de Sonicação.....	64
5.3.2 Amplitude de Sonicação	66
5.4 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO EXPERIMENTAL DO TIPO BOX-BEHNKEN	68
5.5 OTIMIZAÇÃO DOS NANOSSISTEMAS PRODUZIDOS.....	79
5.6 FUNCIONALIZAÇÃO DO NANOSSISTEMA OTIMIZADO	80
5.7 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	85
5.7.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	85
5.7.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	88
5.7.3 Difração de Raio-X (DRX).....	89
5.7.4 Análises Térmicas.....	91
5.8 DOSEAMENTO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	92
5.9 ESTUDO DE ESTABILIDADE	95
5.10 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	100
5.11 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	103
5.12 CINÉTICA DE CRESCIMENTO BACTERIANO.....	106
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	110
7. REFERÊNCIAS	112

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma doença inflamatória que acomete os quartos do úbere da glândula mamária de vacas leiteiras, causando perdas significativas tanto para a indústria de laticínios quanto para pequenos e médios produtores (Goulart; Mellata, 2022; Neculai-Valeanu; Ariton, 2022). Seu impacto reflete na redução da produção e no aumento das taxas de abate do rebanho leiteiro (Morales-Ubaldo *et al.*, 2023). A enfermidade pode ter origens fisiológicas, traumáticas, alérgicas, metabólicas ou infecciosas, frequentemente associada à presença de bactérias patogênicas no canal do teto do animal, sendo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Streptococcus agalactiae* os microrganismos mais detectados na mastite contagiosa (Goulart; Mellata, 2022; Haxhij; Wishart; Ametaj, 2022; Wang *et al.*, 2024).

Diante da proliferação excessiva dos microrganismos patogênicos no canal do teto do animal, o tratamento tradicional com antibióticos se destacou no âmbito populacional visando garantir uma terapia segura e eficaz nos animais acometidos pela doença (Khalifa *et al.*, 2024; Rinky *et al.*, 2025). De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), o uso excessivo e indevido desses medicamentos representa uma ameaça à saúde global, pois desencadeia quadros de resistência antimicrobiana (RAM), resultando no aumento da prevalência de cepas resistentes e na elevação dos resíduos excretados no meio ambiente (Wiśniewski *et al.*, 2024.). Esse fato acomete uma nova problemática, a propagação dos microrganismos no solo e na água contaminada, perpetuando a vulnerabilidade social ao risco de infecções (Endale; Mathewos; Abdeta, 2023).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de estratégias para a administração de fármacos tem se concentrado na preservação das características biológicas das moléculas ativas, com o objetivo de assegurar a eficácia terapêutica, além de reduzir a dose necessária e minimizar a toxicidade no sítio de ação (Chaachouay; Zidane, 2024). Nesse contexto, a pesquisa voltada para o uso de produtos naturais em aplicações terapêuticas tem recebido atenção na comunidade científica, especialmente devido à presença de compostos fitoquímicos com propriedades biológicas relevantes (Najmi *et al.*, 2022). Entre esses compostos, os óleos essenciais destacam-se por suas diversas atividades farmacológicas e pela ampla disponibilidade, resultante da grande diversidade de espécies vegetais das quais podem ser extraídos (Bunse *et al.*, 2022; De Sá Filho *et al.*, 2022).

Nesse contexto, a necessidade do uso de fitocomplexos com ação antimicrobiana no tratamento de mastite bovina, se faz necessária e oportuna. Tem sido mostrado na literatura que os óleos essenciais se destacam devido a suas propriedades e ampla disponibilidade. O óleo

essencial de orégano (OEO) (*Origanum vulgare* L.) é considerado uma alternativa segura e promissora com efetivo potencial antioxidante e antibacteriano, que se dá devido à presença de terpenóides e compostos fenólicos, como timol e carvacrol (Saffarian *et al.*, 2024; Walasek-Janusz *et al.*, 2024).

Não por acaso, se tem relatado os efeitos do óleo essencial como produto natural com eficácia terapêutica contra patógenos, incluindo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Ersanli *et al.*, 2023; Scandorieiro *et al.*, 2023). No entanto, apesar de suas reconhecidas propriedades biológicas, os OEOs são altamente sensíveis a variações ambientais, o que representa um desafio significativo para a sua manipulação. Fatores como alta volatilidade, baixa solubilidade em meios aquosos e propensão à oxidação limitam sua estabilidade e aplicabilidade terapêutica (Fan *et al.*, 2024).

Diante desse contexto, a nanotecnologia desponta como uma estratégia promissora para o encapsulamento e a liberação controlada de bioativos, otimizando sua estabilidade e biodisponibilidade. Essa abordagem tem se mostrado particularmente eficaz na proteção e administração de OEs, preservando suas propriedades terapêuticas e ampliando suas aplicações (Brandelli; Lopes & Pinilla, 2023).

Dentre os sistemas nanotecnológicos, os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) destacam-se por serem compostos por uma matriz lipídica híbrida, contendo frações sólidas e líquidas, estabilizadas por surfactantes. Essa estrutura é vantajosa para o encapsulamento de ativos hidrofóbicos, como os OEs (Rodrigues da Silva *et al.*, 2021).

A composição lipídica dos CLNs desempenha um papel crucial na manutenção da estabilidade do carreador, prevenindo a cristalização lipídica e evitando a expulsão do fármaco encapsulado (Syed Azhar *et al.*, 2022). Além disso, suas propriedades físico-químicas favorecem a permeação através de barreiras biológicas, melhorando a biodisponibilidade do ativo e aumentando sua solubilidade, contribuindo para a redução de efeitos adversos (Nasirizadeh; Malaekheh-Nikouei, 2020). Portanto, os sistemas nanotecnológicos representam uma alternativa inovadora para o encapsulamento de derivados vegetais naturais ou sintéticos. Ao otimizar a farmacocinética e farmacodinâmica, esses sistemas aumentam a eficácia terapêutica, reduzindo a toxicidade e a degradação de compostos voláteis. Dessa forma, tornam-se uma estratégia promissora para o tratamento de diversas doenças, como a mastite bovina (Cimino *et al.*, 2021).

Referencial Teórico

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PRODUTOS LÁCTEOS

Em 2023, o mercado global de laticínios movimentou US\$ 331,80 bilhões, registrando um crescimento anual de 6% (Rinky *et al.*, 2025). No Brasil, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a indústria de produtos lácteos e seus derivados teve um impacto expressivo na economia, alcançando uma produção industrial de aproximadamente R\$ 80,27 bilhões e um volume total de 35,4 bilhões de litros de leite. Minas Gerais se destacou como o maior produtor de leite do país. Sendo assim, os laticínios compõem um dos cinco produtos mais relevantes da agropecuária brasileira, com um crescimento acelerado na região Nordeste e um papel fundamental na segurança alimentar da população (Valério *et al.*, 2024).

Diante do exposto, o leite animal, produto consumido em nível elevado por crianças e idosos, é considerado um fator de transmissão de patógenos, devendo apresentar parâmetros adequados de higiene no manejo e em equipamentos de produção ou manutenção da ordenha, visto que, uma vez em condições inadequadas, podem desempenhar a contaminação no consumo humano (Formaggioni; Franceschi, 2024; Schafer *et al.*, 2025). Diante desse cenário, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil estabelece normas e padrões para a segurança alimentar da população, incluindo a pasteurização do leite, objetivando garantir a saúde pública e a qualidade do produto.

A pasteurização foi desenvolvida pela primeira vez pelo químico francês Louis Pasteur em 1862 na produção de vinho (Schafer *et al.*, 2025). É um método que envolve aplicação de calor com o objetivo de inativar a proliferação de microrganismos patogênicos e, em consequência disso, prolongar a durabilidade do produto (Safwa *et al.*, 2024). Resumidamente, o processo consiste no aquecimento do alimento durante uma temperatura e tempo pré-definidos, seguido do seu rápido resfriamento. Baseado nisso, ele pode ser dividido em três categorias de pasteurização: lenta (LTLT), rápida (HTST) e muito rápida (UHT) (Chiozzi; Agriopoulou; Varzakas, 2022).

Entretanto, embora a pasteurização seja um procedimento regulamentado para a produção de leite, seu uso em muitas fazendas leiteiras tende a ser ínfimo, especialmente entre pequenos e médios produtores. Nesse contexto, a propagação e contaminação por patógenos transmitidos por alimentos representam uma preocupação significativa para a segurança alimentar e a saúde da população (Gazzola *et al.*, 2025). A literatura destaca a mastite bovina

como um dos maiores desafios enfrentados por fazendas leiteiras, resultando na redução da produção de leite, no aumento dos custos com tratamento devido ao uso de antibióticos e, em casos mais graves, no abate de animais afetados pela doença (Debruyn *et al.*, 2025).

2.2 MASTITE BOVINA

A mastite bovina é uma doença infecciosa e inflamatória que afeta o tecido mamário do úbere, sendo causada principalmente pela proliferação de microrganismos patogênicos no interior da glândula mamária (Stanek; Żółkiewski; Januś, 2024). Sua alta incidência está correlacionada ao aumento da produção de leite, com uma estimativa de acometimento da doença entre 15 e 20% das vacas leiteiras por ano (Debruyn *et al.*, 2025). Em suma, trata-se de uma patogenia multifatorial desencadeada por uma combinação de fatores intrínsecos e extrínsecos, como o animal, o ambiente e os agentes patogênicos (Campos *et al.*, 2022; Da Silva Bomfim *et al.*, 2023).

Caracterizada por causar danos em vacas leiteiras, a mastite está diretamente associada à dor e ao comprometimento do bem-estar desses animais, os quais apresentam quadros clínicos típicos de processos inflamatórios, com sintomas como dor, vermelhidão, calor e inchaço (Hagner *et al.*, 2024). Em alguns casos, podem também existir sinais de anorexia e febre (Jyothi *et al.*, 2022). Além disso, leva ao aumento da contagem de células somáticas (CSCs) e a alterações físico-químicas na qualidade do leite, evidenciadas pela descoloração e pelo aparecimento e formação de coágulos (Kaczorowski *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2024).

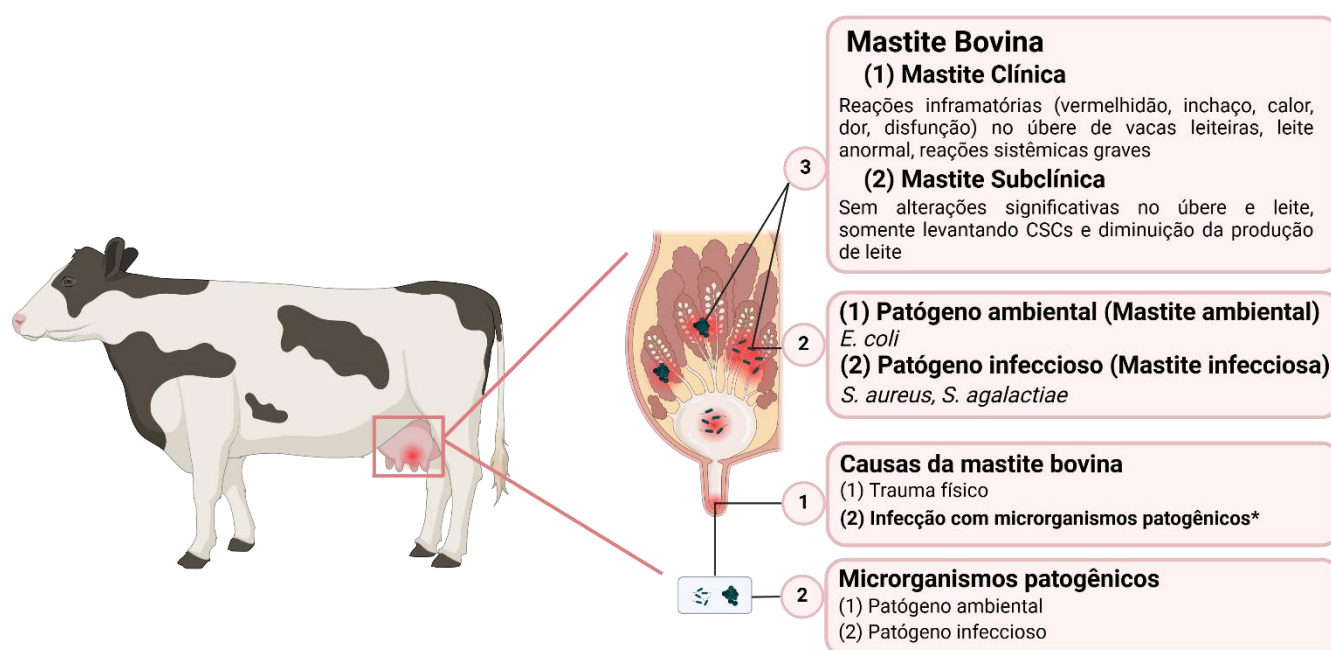
A infecção da glândula mamária é uma condição infecciosa grave classificada como subclínica, quando os sintomas são detectáveis apenas no leite, ou clínica, manifestando-se no início da lactação com anormalidades visíveis na vaca. A forma clínica pode ser peraguda, aguda, subaguda ou crônica (Hagner *et al.*, 2024). Esse último caso pode resultar da falta de tratamento adequado, o que pode levar a impactos negativos, como índices elevados de mortalidade ou infertilidade no rebanho, causando prejuízos ao setor agropecuário (Cheng; Han, 2020; Morales-Ubaldo *et al.*, 2023). Durante a progressão da doença pode ocorrer uma redução da atividade antioxidante no organismo do hospedeiro, resultando em estresse oxidativo nas células epiteliais mamárias (MECs) (Khan *et al.*, 2024).

A literatura afirma que uma de suas formas de contágio pode ser provocada por microrganismos, sendo transmitida diretamente entre os animais ou ser adquirida a partir do ambiente (Lucheis *et al.*, 2024). *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus agalactiae* são amplamente reconhecidos como agentes de infecções contagiosas, enquanto outras espécies de

Streptococcus e *Escherichia* estão mais associados a infecções ambientais (Debruyn *et al.*, 2025). Em contraste, a gravidade da enfermidade varia conforme fatores como a composição genética do hospedeiro, a resposta imune, os mecanismos de virulência e a diversidade genética das bactérias, destacando a importância de aprofundar o conhecimento sobre os agentes responsáveis por essa patologia (Lucheis *et al.*, 2024).

A **Figura 1** mostra a classificação, as principais causas e os microrganismos patogênicos atrelados ao desenvolvimento de mastite bovina em rebanhos leiteiros.

Figura 1. Principais causas de acometimento da mastite bovina em vacas leiteiras



Fonte: Adaptado de Li *et al.* (2023). Legenda: A representação numérica indica as principais causas de mastite em vacas.

Staphylococcus aureus, uma bactéria Gram-positiva, é o principal agente patogênico associado a infecções bacterianas transmitidas por alimentos, destacando-se por sua disseminação no leite e seus derivados (Aguiar *et al.*, 2024; He *et al.*, 2025). Esse microrganismo produz diversos fatores de virulência, incluindo enterotoxinas, enzimas e proteínas de superfície, permitindo sua persistência no tecido mamário por longos períodos e sua ampla excreção do leite (Tong *et al.*, 2025). Ademais, a contaminação por *S. aureus* representa outro fator preocupante, a resistência antimicrobiana (RAM), principalmente em casos de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (Aguiar *et al.*, 2024).

Por outro lado, *Escherichia coli*, um patógeno Gram-negativo comumente envolvido em quadros clínicos de mastite bovina, sintetiza lipopolissacarídeos (LPS), transportadores de

ferro e proteínas de membrana externa para aumentar sua virulência (Tong *et al.*, 2025). Os patógenos coliformes podem se proliferar na glândula mamária sem a necessidade de aderência ao epitélio, possivelmente devido à sua capacidade de metabolizar a lactose, o principal carboidrato do leite. Além disso, a baixa concentração de oxigênio nesse ambiente favorece a colonização e o crescimento desses microrganismos (Egyedy; Ametaj, 2022). Em suma, este agente patogênico pode estar presente no leite cru e em produtos lácteos, representando um risco significativo à saúde pública ao causar doenças graves, como síndrome hemolítico-urêmica, colite hemorrágica e diarreia sanguinolenta (Elbastawesy *et al.*, 2025).

Para garantir a saúde e a produtividade dos rebanhos leiteiros, é fundamental identificar e tratar precocemente a causa da enfermidade. Medidas preventivas, como boas práticas de manejo, monitoramento regular, ordenha adequada, higiene rigorosa e inspeções frequentes do úbere, auxiliam na redução desses problemas sanitários (Ashraf; Imran, 2018; Panchal *et al.*, 2024). Como a forma subclínica não apresenta sinais visíveis, sua detecção inicial ocorre por meio da contagem de células somáticas, que avalia a quantidade de glóbulos brancos no leite (Ferronato *et al.*, 2018). Essa contagem pode ser realizada por microscopia direta ou por testes indiretos, como o *California Mastitis Test* e o *Surf Field Mastitis Test*, os quais fornecem apenas uma indicação qualitativa de altas ou baixas contagens celulares (Ashraf; Imran, 2020).

A cultura bacteriana tem sido tradicionalmente o método de referência para o diagnóstico da mastite infecciosa. No entanto, avanços em técnicas moleculares, que combinam métodos de fenotipagem e genotipagem, proporcionam uma identificação mais rápida e precisa dos patógenos, inclusive em níveis de espécies e subespécies (El-Sayed *et al.*, 2017; El-Sayed; Kamel, 2021). A maior sensibilidade e especificidade da reação em cadeia da polimerase (PCR) e da espectrometria de massa por tempo de voo com dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) as consolidaram como padrões emergentes, permitindo não apenas a identificação do genótipo envolvido, mas também a detecção de genes de resistência a antibióticos (Barreiro *et al.*, 2017; El-Sayed *et al.*, 2017; El-Sayed; Kamel, 2021).

2.3 PATOGENIA

A mastite bovina é uma enfermidade infecciosa caracterizada por uma intensa resposta inflamatória. Durante o processo infeccioso, os patógenos penetram no úbere através do canal do teto, interagindo com células epiteliais e imunológicas, como os monócitos (Hasankhani *et al.*, 2023). De acordo com Xu *et al.* (2024), essas bactérias possuem mecanismos de adesão e infecção das células epiteliais da glândula mamária, promovendo a formação de biofilmes. Os

biofilmes consistem em complexos estruturais de polissacarídeos e proteínas, nos quais bactérias aderem a superfícies vivas ou inertes, envolvidas por uma matriz de polímeros extracelulares (EPS) secretados pelos próprios microrganismos. Esse processo facilita a colonização da glândula mamária pelo patógeno, favorecendo sua multiplicação e a persistência de infecções intramamárias recorrentes.

Em geral, esse mecanismo envolve o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes na superfície celular (Xu *et al.*, 2024). A ativação excessiva desses receptores leva à secreção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas (ILs), fatores de necrose tumoral (TNFs) e quimiocinas, desencadeando uma resposta inflamatória exacerbada no local da infecção. Para um controle mais eficaz da patologia, células do sistema imune, como neutrófilos e monócitos, são recrutadas para o foco inflamatório, atuando no combate e na contenção do processo infeccioso (Hasankhani *et al.*, 2023).

Nesse contexto, como destacado por Bi *et al.* (2020), os receptores *Toll-like* tipo 2 e 4 (TLR2 e TLR4) desempenham um papel crucial na resposta imune contra espécies de *Staphylococcus*. O TLR2 é essencial para induzir fagocitose e autofagia em macrófagos, enquanto TLR4 está envolvido na mediação da inflamação peritoneal e da fibrose em resposta a níveis elevados de glicose. Além disso, a ativação desses receptores desencadeia uma cascata de sinalização que leva à ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e da proteína ativadora 1 (AP-1), sendo o primeiro um regulador central da inflamação. Esse mecanismo resulta no recrutamento intensificado de células imunes e na secreção de citocinas e quimiocinas no local da infecção, promovendo a resposta inflamatória.

Por outro lado, no caso da *E. coli*, sua patogenicidade está associada a diversos fatores de virulência, como toxinas, hemolisinas, adesinas e lipopolissacarídeos, conforme mencionado anteriormente. Ademais, estudos indicam que a incidência dessas infecções é maior durante a involução, fase de repouso da glândula mamária, e no período de periparto, sendo influenciada por fatores intrínsecos ao próprio hospedeiro (Bhattarai *et al.*, 2018). De acordo com Bhattarai *et al.* (2018), os lipopolissacarídeos da parede celular bacteriana são reconhecidos pelos receptores da célula hospedeira, desencadeando o processo de patogênese da mastite. Esse reconhecimento ativa a produção de citocinas, que, por sua vez, estimulam a quimiotaxia de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) para a região da glândula mamária, na tentativa de conter a infecção.

Corroborando com as informações anteriores, um estudo conduzido por Fu *et al.* (2013) analisou diferenças específicas na resposta imune entre infecções causadas por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. No primeiro caso, há inativação pelo calor em

células epiletiais mamárias bovinas, resultando em uma regulação positiva da expressão de mRNA dos receptores TLR2 e TLR4, acompanhada por uma superexpressão de TNF-alfa, IL-1, IL-6 e IL-8. Já em infecções por *S. aureus*, apenas o mRNA de TLR2 foi regulado positivamente, com um aumento significativo de citocinas na presença da bactéria inativada pelo calor. Por outro lado, observou-se que *E. coli* foi capaz de induzir a ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB), efeito que *S. aureus* não conseguiu replicar. Finalmente, outro estudo de expressão de citocina *in vitro* apontou que *E. coli* promove maior atividade de IL-1b, IL-8 e TNF-alfa em comparação a *S. aureus* (Bhattarai *et al.*, 2018).

Dessa forma, a atenuação do processo inflamatório e do dano oxidativo em bovinos leiteiros tornou-se uma prioridade na busca por estratégias terapêuticas eficazes (Lin *et al.*, 2025). Nesse contexto, o uso de antibióticos desempenha um papel fundamental no controle da mastite bacteriana, ajudando a eliminar os patógenos responsáveis pela infecção e reduzindo a severidade da inflamação (Li *et al.*, 2023). No entanto, a escolha do antibiótico adequado deve levar em consideração a suscetibilidade do agente infeccioso, a farmacocinética da substância e seu tempo de depuração, a fim de evitar resíduos no leite e no ambiente (Wang *et al.*, 2024).

2.4 ANTIBIOTICOTERAPIA

O uso de extensivo de antibióticos para garantir uma terapia segura e eficaz nos animais acometidos pela doença resulta no acúmulo de resíduos e metabólitos nos tecidos e órgãos, que posteriormente são excretados no leite (Khalifa *et al.*, 2024; Rinky *et al.*, 2025). Nos dias atuais, os antibióticos convencionais ainda são considerados a melhor opção de tratamento para a doença intramamária que acomete os rebanhos leiteiros, sejam bovinos, caprinos ou ovinos (Lipkens; Piepers; De Vliegher, 2023).

A administração medicamentosa geralmente requer uma injeção intramamária no úbere do animal, através do canal do teto, sendo frequentemente acompanhada pela aplicação de um selante (Cheng; Han., 2020). Este último atua como uma barreira física contra a invasão bacteriana, reforçando o mecanismo de defesa natural proporcionado pelo tampão de queratina (Öney; Karadağ; Kaya, 2023). Entretanto, a presença de resíduos de antibióticos em níveis superiores aos limites máximos residuais (LMR) estabelecidos para alimentos de origem animal pode acarretar riscos significativos à saúde pública (Arsène *et al.*, 2022).

A resistência antimicrobiana (RAM) tem sido amplamente associada a efeitos adversos, incluindo reações de hipersensibilidade, distúrbios gastrointestinais e até mesmo o desenvolvimento de neoplasias (Khalifa *et al.*, 2024; Mukasafari *et al.*, 2025). Aliado a isso, a exposição prolongada pode desencadear quadros clínicos severos, como efeito teratogênico,

leucocitose, toxicidade da medula óssea, disbiose intestinal e nefropatias (Ricky *et al.*, 2025).

Adicionalmente, uma parcela significativa dos antibióticos administrados é metabolizada e subsequentemente excretada, resultando na liberação de resíduos farmacêuticos no meio ambiente (Barathe *et al.*, 2024). Esse processo contribui para a contaminação do solo e da água, promovendo a emergência de cepas bacterianas resistentes (Khalifa *et al.*, 2024). Esse fenômeno ocorre devido à capacidade dos resíduos de antibióticos de sofrerem regeneração química, o que pode levar à reativação parcial ou total do fármaco e à sua persistência ambiental (Rinky *et al.*, 2025). Por exemplo, determinados antibióticos, como tetraciclina, sulfametazina e eritromicina, apresentam alta estabilidade no ambiente, os quais apresentam efeitos negativos relacionados às neoplasias (Treiber; Beranek-Knauer, 2021).

Em um estudo conduzido na região da Bósnia e Herzegovina, por exemplo, maior resistência antimicrobiana em cepas de *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Escherichia* foi observada contra benzilpenicilina (56,3%) e oxitetraciclina (46,2%) (Burović, 2020). Dado que *S. aureus* é o principal agente causador da doença, outro estudo realizado na China com esta espécie concluiu que das amostras positivas para mastite, 92% eram resistentes a pelo menos dois antibióticos, com destaque para a penicilina G. Portanto, a terapia com sulfametoxazol/trimetoprima foi considerada a mais eficaz (Zhang *et al.*, 2022).

Diante da toxicidade e dos impactos ambientais e sanitários decorrentes do uso excessivo de antibióticos, diversas agências reguladoras internacionais, como a Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA), Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a União Europeia (UE), estabeleceram diretrizes rigorosas, incluindo limites máximos de resíduos e períodos de carência específicos para cada antibiótico (Arsène *et al.*, 2022; Pratiwi *et al.*, 2023). No Brasil, a ANVISA determina a adoção de medidas sanitárias rigorosas para o controle da presença de resíduos em produtos de origem animal, garantindo a segurança alimentar e a qualidade dos derivados lácteos destinados ao consumo humano (Rinky *et al.*, 2025). Somado a isso, ainda é necessário que novos métodos de tratamento sejam desenvolvidos para superar o problema da resistência bacteriana e garantir um produto final de qualidade para os consumidores.

2.5 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais vêm desempenhando um papel de destaque na pesquisa devido à rica variedade de moléculas bioativas que oferecem diferentes atividades biológicas e contribuem para a descoberta de vários medicamentos (Atanasov *et al.*, 2021; Duarte; Luís; Gallardo, 2022). Essas moléculas são derivadas de microrganismos, fungos, animais e plantas,

sendo o reino vegetal particularmente relevante por sua vasta diversidade e propriedades medicinais bem documentadas (Ekiert; Szopa, 2020). Entre as atividades terapêuticas frequentemente relatadas, destacam-se as propriedades anticancerígenas (Rojas-Armas *et al.*, 2020; Subhawa; Chewonarin; Banjerdpongchai, 2020), imunomoduladoras (Ilin *et al.*, 2020), anti-inflamatórias (Pudžiulytė *et al.*, 2020), antioxidantes e propriedades antibacterianas (Elmi *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2023).

Com o aumento da prevalência de bactérias resistentes a antibióticos, a busca por novas alternativas antimicrobianas, como os produtos naturais, tem ganhado destaque. Esse problema atual tem sido amplamente estudado na busca por moléculas com potencial fitoquímica e farmacológico (Lopes *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2023). Compostos como flavonoides e bioativos fenólicos apresentam atividade antimicrobiana, que está diretamente associada à sua distribuição nas plantas (Roy *et al.*, 2022; Lobiuc *et al.*, 2023).

Nesse contexto, as plantas produzem metabólitos primários que são essenciais para sua sobrevivência e metabólitos secundários, como óleos essenciais, desempenhando um papel fundamental na defesa vegetal. Essas moléculas de baixo peso molecular possuem atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica e inseticida, além de tornar as plantas menos atraentes para serem consumidas por herbívoros. Isso pode ser justificado devido ao sabor desagradável, odor forte ou a presença de compostos que causam efeitos adversos aos animais (Tian *et al.*, 2018; Caneschi *et al.*, 2023).

Os óleos essenciais são líquidos oleosos formados por misturas complexas de compostos químicos, voláteis ou não (Saffarian *et al.*, 2024). São compostos principalmente de terpenóides e ácidos fenólicos, cuja natureza lipofílica de seus grupos funcionais facilita a interação com as membranas bacterianas, permitindo sua entrada na célula e inibindo ou eliminando microrganismos patogênicos responsáveis por doenças infecciosas, como a mastite bovina (Pontes-Quero *et al.*, 2021). Além disso, a maioria dos óleos essenciais apresenta coloração incolor ou amarelo-claro, sendo líquido à temperatura ambiente e insolúvel em água (Sharmeen *et al.*, 2021; De Sousa *et al.*, 2023).

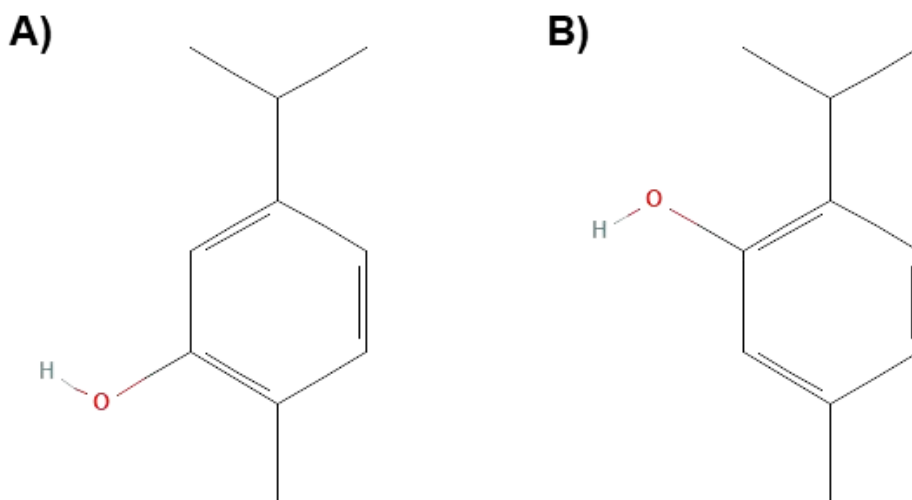
Dentre os principais óleos essenciais com atividade biológica destacam-se o óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), lavanda (*Lavandula angustifolia*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e orégano (*Origanum vulgare* L.) (Puvača *et al.*, 2021). Este último se destaca por sua potente atividade antimicrobiana, atribuída à sua composição química, apresentando aplicações promissoras na saúde humana e animal, além de desempenhar um papel importante na segurança alimentar e conservação de alimentos (Tomić; Šovljanski; Erceg, 2023).

2.6 ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO

O óleo essencial de orégano (OEO) é extraído de *Origanum vulgare* L., planta pertencente à família Lamiaceae, conhecida popularmente como orégano grego (Fan *et al.*, 2024; Saffarian *et al.*, 2024). Essas plantas são perenas e aromáticas, com variadas formas de extração e uso, à exemplo da planta fresca, droga vegetal e do óleo essencial, os quais caracterizam amplas aplicações terapêuticas, destacando-se por suas atividades antioxidantes, antibacterinas, antifúngicas, antiinflamatórias e antitumoral (Pontes-Quero *et al.*, 2021).

Composto majoritariamente por carvacrol e timol, monoterpenos fenólicos derivados de duas unidades de isoprenos, o óleo essencial de orégano tem se destacado por suas propriedades conservantes e pelo seu potencial no tratamento de doenças, especialmente as infecciosas (De Sousa *et al.*, 2023). Ao longo dos anos, diversos estudos vêm comprovando a eficácia do óleo como produto natural com eficácia terapêutica contra agentes patogênicos, incluindo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Ersanli *et al.*, 2023; Scandorieiro *et al.*, 2023). Entretanto, é importante ressaltar que a sua composição química e suas atividades farmacológicas tendem a variar dependendo de condições ambientais e de cultivo, localização geográfica, tempo de coleta, método de extração e armazenamento e processamento pós-colheita (Qaderi; Martel; Strugnell, 2023; Hazrati; Mousavi; Nicola, 2024).

Figura 2. Monoterpenos fenólicos carvacrol (A) e timol (B), compostos majoritários do óleo essencial de orégano



O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) é um monoterpene fenólico encontrado em óleos essenciais de diversas plantas da família Lamiaceae, com propriedades biológicas e farmacológicas diversas. Esse metabólito apresenta um ponto de ebulição em 236-237 °C e densidade de 0,976 g/cm³ a 20 °C, responsáveis pela possibilidade de separação cromatográfica e caracterizando-o por uma solubilidade acentuada em etanol, acetona e éter dietílico, ao passo que em meio aquoso ele se torna insolúvel (Mączka *et al.*, 2023). Em contraste, o timol (2-isopropil-5-metilfenol) apresenta ponto de ebulição em 232-233 °C e densidade de 0,969 g/cm³ a 25 °C, é um composto incolor, com odor característico e ligeiramente insolúvel em água (Kowalczyk *et al.*, 2020)

Ambos são biossintetizados pela hidroxilação do p-cimeno após a aromatização do γ -terpineno em p-cimeno, pertencente a via do mevalonato. São compostos amplamente utilizados na indústria alimentícia devido às suas propriedades antimicrobianas (Mączka *et al.*, 2023). Isso pode ser justificado através da presença do grupo funcional hidroxila em sua estrutura, responsável provocar a redução da formação de biofilme, inibição da motilidade e das bombas de efluxo e ruptura da parede celular bacteriana, resultando na morte celular (Farhadi *et al.*, 2024; Peter; Sotondoshe; Aderibigbe, 2024).

Contudo, o óleo essencial de orégano é altamente instável e suscetível a mudanças oriundas de fatores extrínsecos como luz, temperatura, oxigênio e umidade. Arelado a isso, sua elevada volatilidade, reatividade e hidrofobicidade em sistemas hidrofílicos e em fluidos biológicos representam um desafio para o viés industrial (Pontes-Quero *et al.*, 2021; Fan *et al.*, 2024). Diante disso a nanotecnologia surge como alternativa promissora, permitindo o encapsulamento e a vetorização dessas moléculas bioativas para aplicações terapêuticas (Brandelli; Lopes & Pinilla, 2023).

2.7 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

A nanotecnologia surgiu na década de 1980 e, embora tenha origens antigas, é vista como uma ciência em expansão, notável pela manipulação de átomos e moléculas em escala nanométrica variando entre 10 e 1000 nanômetros (Zhu *et al.*, 2025). Suas aplicações abrangem diversas áreas, como biotecnologia, farmácia, ciências dos materiais, alimentos e agricultura, promovendo avanços inovadores, especialmente na liberação controlada de fármacos e biomoléculas (Altammar, 2023). Além disso, essa tecnologia vem revolucionando o diagnóstico e o tratamento de diversas doenças, com destaque para as cardiovasculares e o câncer (Shang *et al.*, 2024).

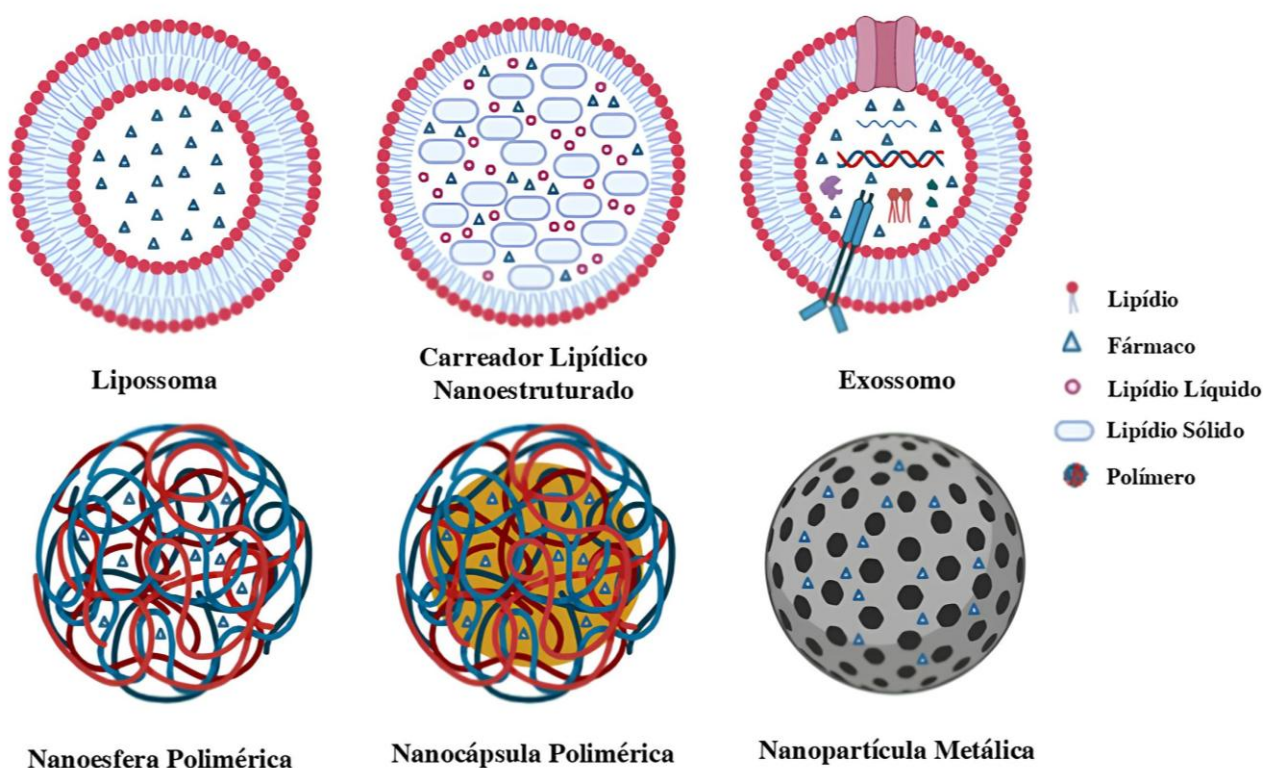
De modo geral, os nanomateriais possuem alta permeabilidade em órgãos e tecidos, atuando como agentes de direcionamento que viabilizam a entrega eficiente e segura de compostos bioativos e moléculas específicas em seus locais-alvo, à exemplo das células cancerosas (Alrushaid *et al.*, 2023; Wang; Fu; Zhang, 2025). Suas vantagens incluem a possibilidade de desenvolvimento em diferentes tamanhos e flexibilidade na escolha dos materiais utilizados em sua produção, que podem ser orgânicos, como lipídios e polímeros ou inorgânicos, como ouro, ferro e prata (Domingues *et al.*, 2023).

As nanopartículas são caracterizadas por seu tamanho reduzido, o que favorece a formação de novas ligações e a modificação das propriedades moleculares, resultando no desempenho de funções específicas, como a interação com fármacos e a menor exposição sistêmica, além de reduzir os índices de depuração e captura celular pelo organismo (Al-Thani *et al.*, 2024). Nesse contexto, esses sistemas têm sido amplamente utilizados como ferramentas promissoras para terapias farmacológicas, devido à sua alta capacidade de transporte de fármacos, redução da toxicidade, alta estabilidade, eficácia, seletividade e melhor tolerabilidade em comparação com os medicamentos convencionais (Hsu *et al.*, 2023; Yusuf *et al.*, 2023).

Nanopartículas poliméricas, inorgânicas, lipídicas, lipossomas, nanocomplexos, niossomas, entre outros, representam classes distintas de sistemas nanotecnológicos amplamente utilizados no desenvolvimento de formulações para a liberação controlada de fármacos (Mall *et al.*, 2024). A seleção do nanocarreador é intrinsecamente dependente da composição química de seus constituintes, do seu método de produção e da aplicação tópica desejada, exercendo influência sobre as propriedades críticas da formulação (Hsu *et al.*, 2023).

A **Figura 3** representa os principais sistemas nanotecnológicos empregados na administração de medicamentos e categorizados de acordo com sua composição estrutural.

Figura 3. Estrutura dos sistemas nanotecnológicos de destaque para aplicação terapêutica



Fonte: Adaptado de Silva *et al.* (2023)..

2.7.1 Lipossomas

Os lipossomas estão classificados como sistemas lipídicos anfifílicos e são caracterizados como partículas esféricas com diâmetro médio variando entre 80 e 1000 nm (Wu *et al.*, 2024). Estruturalmente, consistem em uma bicamada lipídica que forma vesículas capazes de encapsular um núcleo, o qual pode ser de natureza hidrofílica ou lipofílica (Al-Jipouri *et al.*, 2023). No primeiro caso, o composto ativo é inserido no núcleo aquoso, enquanto no segundo, ele se distribui na bicamada lipídica. Em ambos os cenários, estima-se uma entrega eficaz do composto no local específico de ação (Tomnikova; Orgonikova; Krizek, 2022)..

Sua composição lipídica confere aos lipossomas uma vantagem significativa no transporte de fármacos, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e versatilidade no encapsulamento (Nsairat *et al.*, 2022). Eles são comumente empregados como veículos para uma ampla gama de materiais bioativos, como DNA, proteínas, peptídeos e enzimas (Lombardo; Kiselev, 2022). Contudo, não obstante suas propriedades vantajosas, os lipossomas, em sua maioria, apresentam uma baixa eficiência de encapsulamento quando comparados a outros nanossistemas, além de elevadas instabilidades físico-químicas, baixa

solubilidade, rápida detecção pelo sistema imunológico e dificuldades na liberação do ativo de acordo com a cinética esperada (Nakhaei *et al.*, 2021; Al-Jipouri *et al.*, 2023).

2.7.2 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas, por sua vez, se destacam como um sistema inovador na nanomedicina. Compostas por polímeros naturais, sintéticos ou semissintéticos, biocompatíveis e biodegradáveis, essas partículas possuem uma escala nanométrica que pode atingir até 1000 nm, característica atribuída à sua matriz polimérica densa (Elmowafy *et al.*, 2023). Esse sistema representa uma alternativa promissora no diagnóstico e na administração de medicamentos, sendo desenvolvido com o intuito de potencializar sua ação terapêutica, reduzindo possíveis efeitos colaterais e o vazamento do fármaco encapsulado (Ezike *et al.*, 2023). Além disso, ao contrário dos lipossomas, os sistemas baseados em polímeros oferecem uma capacidade cinética de liberação controlada, com índices reduzidos de toxicidade, proporcionando um efeito terapêutico sustentado e localizado (Kuperkar *et al.*, 2024; Zhuo; Zhao; Zhang, 2024).

Esses sistemas poliméricos podem ser categorizados em nanocápsulas ou nanoesferas. Conforme descrito na literatura de Naser *et al.* (2024), as nanocápsulas são reconhecidas como sistemas vesiculares, caracterizados por um núcleo, que pode ser aquoso ou oleoso, envolto por uma membrana polimérica. Em contraste, as nanoesferas constituem sistemas de matriz polimérica, nos quais o fármaco é distribuído de maneira uniforme. No entanto, ambos apresentam algumas limitações, como reprodutibilidade reduzida, problemas relacionados à degradação e o potencial de induzir respostas antigênicas, mesmo quando os polímeros utilizados são de origem natural (Silva *et al.*, 2023).

2.7.3 Nanopartículas inorgânicas

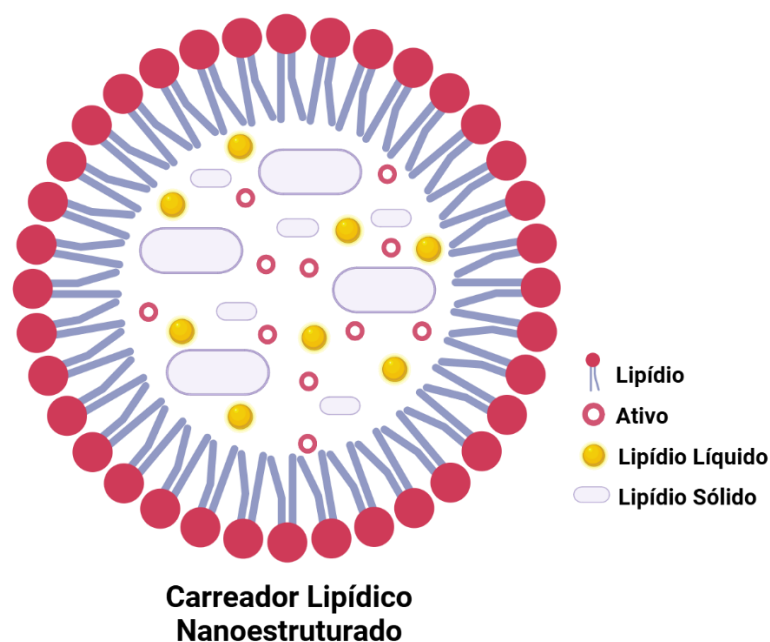
As nanopartículas inorgânicas são constituídas por um núcleo inorgânico (como metais ou semicondutores) revestidos por polímeros orgânicos (Burduşel *et al.*, 2022; Yanar; Carugo; Zhang, 2023). Com propriedades cruciais para tratamentos biomédicos e obtenção de imagens teranósticas, esses materiais se destacam na área da nanomedicina (Yanar; Carugo; Zhang, 2023). Geralmente, as nanopartículas metálicas apresentam tamanho reduzido, alta relação superfície-volume, biocompatibilidade e estabilidade, além da possibilidade de alteração superficial por meio da síntese e interação com produtos funcionais (Burduşel *et al.*, 2022; Serna-Gallén; Mužina, 2024). Contudo, esta classe de nanopartículas apresenta riscos

significativos à segurança, como a facilidade de ser excretado inadequadamente através da depuração renal, o que pode resultar em toxicidade sistêmica em órgãos e tecidos (Wang *et al.*, 2024).

2.7.4 Carreadores lipídicos nanoestruturados

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) são sistemas lipídicos de segunda geração altamente promissores na terapia farmacológica. Surgiram a partir das nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs), compostas por um lipídio sólido que induzia a solidificação e expulsão do ativo encapsulado, resultando no aumento do tamanho das partículas e na instabilidade para a entrega do fármaco, como risco de gelificação e vazamento da matriz lipídica (Chauhan *et al.*, 2020). Os carreadores têm tamanho entre 200 e 400 nm e sua composição estrutural permite forte imobilização do ativo, evitando a coalescência das partículas (Syed Azhar *et al.*, 2022). Isso confere à sua estrutura uma forma amorfa e menos ordenada, compactada em uma mistura de lipídio sólido e líquido, tensoativo lipofílico e tensoativo hidrofílico disperso em meio aquoso (Chauhan *et al.*, 2020). Os tensoativos são compostos responsáveis por diminuir a tensão entre a fase lipídica e aquosa, minimizando a toxicidade e promovendo maior permeabilidade do ativo no local de ação (Rodrigues *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022).

Figura 4. Estrutura de um Carreador Lipídico Nanoestruturado (CLN)



Fonte: Próprio autor, 2025.

A inserção do lipídio líquido na estrutura do nanossistema visa potencializar a carga efetiva do medicamento, promovendo uma maior eficiência de encapsulamento (John *et al.*, 2024). Isso contribui para a melhoria da estabilidade e liberação controlada do fármaco, além de conferir propriedades de hidratação e penetração da pele, por meio do efeito oclusivo, o que torna esses sistemas particularmente adequados para o tratamento de feridas e condições dérmicas (Akombaetwa *et al.*, 2023; Graván *et al.*, 2023). Ademais, o mecanismo de liberação controlada dos CLNs proporciona uma administração precisa da dose medicamentosa, garantindo uma janela terapêutica segura, otimizada e minimizando os índices de toxicidade, o que maximiza a eficácia do tratamento e reduz efeitos adversos (Wathoni *et al.*, 2024).

Em aplicações tópicas, os carreadores lipídicos nanoestruturados são amplamente utilizados devido à sua excelente adesão à pele (Yu *et al.*, 2021). Esse sistema possibilita a aplicação de uma vasta gama de compostos bioativos, tanto lipofílicos quanto hidrofílicos, com efeitos locais ou sistêmicos, sendo particularmente eficaz no tratamento de diversa doenças, como a mastite bovina, considerando a melhora na absorção de substâncias (Sambhakar *et al.*, 2023). Ao considerar sua similaridade aos componentes celulares naturais, eles facilitam a interação com células e tecidos. Ademais, seus componentes são biodegradáveis e de baixa toxicidade, características que tornam essas nanoestruturas altamente promissoras para a administração de agentes antimicrobianos (Viegas *et al.*, 2023).

A produção dos carreadores lipídicos é comumente realizada pelo método de emulsão a quente seguido de sonicação, conforme indicado na literatura. A técnica consiste em uma dissolução do lipídio orgânico, formando uma solução lipídica que é emulsionada em uma fase aquosa sob aquecimento e agitação (Khairnar *et al.*, 2022). Esse processo resulta em uma emulsão do tipo óleo em água (O/A), a qual será submetida a um sonificador de ponteira ultrassônica – responsável por reduzir o tamanho das partículas por cavitação mecânica – (Viegas *et al.*, 2023; Zhao; Wang; Huang, 2024). Para tanto, é necessário um controle rigoroso dos parâmetros de produção para garantir elevados índices de reprodutibilidade e praticidade. A adequação dos parâmetros contribui para minimizar possíveis falhas ao longo do processo, reduzindo custos adicionais que poderiam aumentar o preço do produto (Sandhya *et al.*, 2021).

Dependendo da composição e concentração dos constituintes, os carreadores podem se apresentar na forma sólida à temperatura ambiente (Tang; Chen; Dong, 2023; Viegas *et al.*, 2023). Nesses casos, a tendência à formação de agregados lipídicos pode indicar um desequilíbrio na formulação ou baixa eficiência no processo, resultando em menor compactação do lipídio líquido no núcleo da matriz (Pinilla; Lopes; Brandelli, 2021). Esse fator pode

influenciar na qualidade de futuras aplicações biológicas. Nesse cenário, a modificação da superfície das partículas surge como alternativa promissora para otimizar a interação entre os componentes, reduzir a citotoxicidade, além de aprimorar sua entrega ao alvo específico (Upadhyay *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2024).

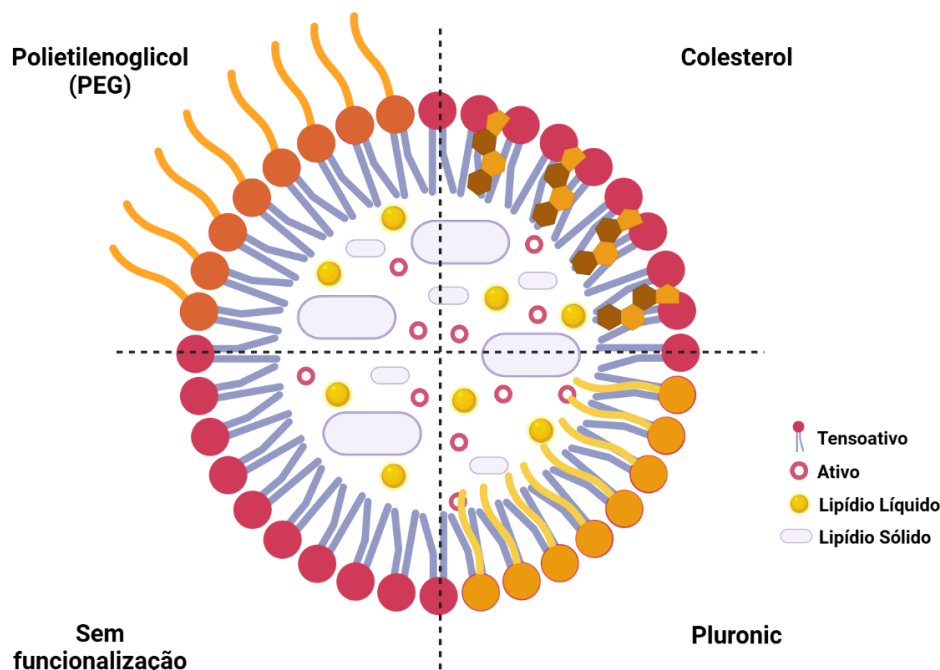
2.7.4.1 Funcionalização dos carreadores lipídicos nanoestruturados

A funcionalização dos carreadores lipídicos nanoestruturados tem como objetivo aprimorar o desempenho de sistemas nanoparticulados na entrega de fármacos (Martinez-Borrajó; Diaz-Rodriguez; Landin, 2024). Ao modificar a superfície, as nanopartículas interagem quimicamente com grupos funcionais que alteram suas propriedades físico-químicas. Em alguns casos, suas características são moduladas, e seu perfil de imunogenicidade e interação celular é alterado, além de impactar na liberação controlada e proteção contra a formação de aglomerados (Upadhyay *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2024).

A modificação de um nanossistema pode ser realizada pela adição de ligantes ou compostos específicos, como macromoléculas, tensoativos, lipídios, peptídeos e imunoglobulinas, por meio de interações covalentes ou não covalentes (Priya; Desai; Singhvi, 2022; Laskar *et al.*, 2023). Esse mecanismo otimiza a resposta com alvos biológicos e estabelece características físico-químicas seguras e estáveis às nanopartículas quando no microambiente do local de ação (Priya; Desai; Singhvi, 2022).

A **Figura 5** demonstra como ocorre o revestimento das nanopartículas a partir da sua superfície (como no caso do polietilenoglicol (PEG), da inserção de um agente estabilizante (como no caso do Pluronic® F-68) ou através de lipídios de membrana que a tornam mais fluída (como no caso do colesterol) (Priya; Desai; Singhvi, 2022; Graván *et al.*, 2023).

Figura 5. Exemplos de componentes utilizados na modificação da superfície dos CLNs



Fonte: Próprio autor, 2025. Legenda: Carreador lipídico nanoestruturado sem funcionalização e com modificação de superfície através de compostos como polietilenoglicol (PEG), Pluronic® F-68 e colesterol.

2.8 NANOTECNOLOGIA APLICADA NO TRATAMENTO DA MASTITE

A nanotecnologia tem sido uma abordagem inovadora para o diagnóstico e tratamento de inúmeras doenças, permitindo a distribuição de medicamentos de forma mais eficaz e específica para o tecido alvo, minimizando o risco de toxicidade celular e efeitos colaterais adversos (Raj *et al.*, 2021). Juntamente com essas vantagens, os nanossistemas têm mostrado perfil inibitório aprimorado contra microrganismos, promovendo uma melhor atividade antimicrobiana e antibiofilme para infecções intramamárias e sendo dispersíveis em condições fisiológicas (Orellano *et al.*, 2019; Yadav *et al.*, 2022). Esse discurso impulsiona vários estudos usando aplicações distintas de nanopartículas, como nanopartículas inorgânicas, poliméricas e lipídicas, destacando seu potencial na prevenção e tratamento da mastite bovina.

Nanopartículas inorgânicas vêm despertado grande interesse como agentes terapêuticos promissores para o tratamento dessa infecção (Neculai-Valeanu *et al.*, 2021). Essas partículas têm demonstrado eficácia significativa na modulação do ambiente microbiano em locais de infecção, devido às suas propriedades antibacterianas e antibiofilme, que atuam por meio da liberação de íons metálicos, ruptura da membrana e/ou parede celular, geração de

espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibição da replicação adequada do DNA (Algharib; Dawood; Xie, 2020; Neculai-Valeanu *et al.*, 2021). Além de seu evidente potencial terapêutico, estudos recentes elucidaram diferentes aspectos das interações de nanopartículas inorgânicas e patógenos, destacando o papel duplo das nanopartículas de ouro não apenas no tratamento, mas também na prevenção da mastite bovina.

Nanopartículas de prata (AgNPs) são amplamente reconhecidas por suas propriedades biocidas, facilitando a redução ou inibição do crescimento bacteriano entre cepas Gram-positivas e Gram-negativas por meio da ruptura da membrana celular e estruturas intracelulares (Lange *et al.*, 2021; Ely *et al.*, 2022). Dados experimentais derivados de várias cepas de *Staphylococcus aureus*, originários de casos clínicos e subclínicos de mastite submetidos a AgNPs, ilustram a eficácia dessas estruturas em nanoescala na promoção dos efeitos antimicrobianos desejados e na melhoria da saúde animal. Notavelmente, essas propriedades foram observadas em AgNPs quando usadas de forma independente ou incorporadas em complexos, com o último demonstrando maior potência (Elbehiry *et al.*, 2019; Lange *et al.*, 2021; Kalińska *et al.*, 2023).

Outros exemplos notáveis incluem nanopartículas de ouro (AuNPs), nanopartículas de cobre (CuNPs) e nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs). Essas nanoestruturas foram examinadas em espécies microbianas significativas, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, revelando seu potencial para exercer efeitos antibacterianos (Hozyen *et al.*, 2019; Machado *et al.*, 2022; Radzikowski *et al.*, 2023). O uso dessas formulações metálicas em concentrações baixas, mas eficazes, levanta discussões críticas sobre suas preocupações com toxicidade e ressalta o potencial dessas nanopartículas na prevenção da mastite bovina, se implementadas com consideração cuidadosa.

Um exemplo tangível de produtos naturais encapsulados por nanotecnologia é o polímero de quitosana. Estudos como o conduzido por Orellano *et al.* (2019) demonstraram o potencial de inibir a formação de biofilme, que funciona causando danos às membranas celulares bacterianas. Além disso, os autores também avaliaram, por meio de um estudo comparativo, que a eficácia da quitosana encapsulada em nanopartículas tende a ser maior do que a do polímero nativo.

Vários estudos corroboram os achados de Orellano *et al.* (2019), reiterando que as nanopartículas de quitosana exibem efeitos bactericidas significativos e inibem efetivamente a formação de biofilme em cepas de *Staphylococcus aureus*. É importante notar que esses efeitos foram dependentes do tamanho, com partículas menores apresentando maior eficácia, destacando a importância da otimização do tamanho das partículas em seu processo produtivo

(Orellano *et al.*, 2019). Além disso, também foi observado que nanopartículas de quitosana demonstraram a capacidade de desintegrar biofilmes pré-formados e prevenir sua formação em *Pseudomonas* sp., apresentando atividade antimicrobiana e emergindo como uma via promissora para o tratamento antibiótico de mastite bovina (Rivera Aguayo *et al.*, 2020).

Machado *et al.* (2022) avaliaram os níveis de toxicidade e o efeito citoprotetor de uma nanoemulsão contendo o extrato de *Achyrocline satureioides*, uma planta medicinal nativa da América do Sul, em células alveolares mamárias bovinas - T (MAC-T). Eles descobriram que este produto natural é rico em compostos químicos como a quercetina, um flavonoide, que contribui para o aumento da permeabilidade do epitélio mamário. Como resultado, foi observado que o efeito da quercetina é potencializado quando incorporada em nanoemulsões. Os pesquisadores avaliaram a taxa de morte celular necrótica ou apoptótica usando citometria de fluxo, observando maior permeação de quercetina e 3-O-metilquercetina em comparação ao extrato livre. Isso demonstrou o aumento do efeito citoprotetor e da permeabilidade da nanoemulsão contendo o extrato de *Achyrocline satureioides*, indicando seu potencial promissor para o tratamento de mastite.

Por outro lado, a espécie *Copaifera reticulata* Ducke, comumente conhecida como oleorresina de copaíba, é um produto natural já descrito na literatura por suas propriedades anti-inflamatórias e antibacterianas. Com base nesse conhecimento, Campanholi *et al.* (2023) conduziram um estudo usando uma formulação de emulgel carregada com oleorresina de copaíba especificamente para o tratamento da mastite bovina. Seus ensaios demonstraram a capacidade da formulação de formar simultaneamente uma película protetora nos tetos e liberar compostos quimioterápicos nas camadas mais profundas da pele do animal, correspondendo à eficácia anti-inflamatória observada com produtos comerciais comuns (Campanholi *et al.*, 2023).

Além disso, essa mesma emulsão manteve uma baixa contagem de bactérias aeróbicas mesófilas tanto no leite quanto nas tetas do animal, confirmando a eficácia dessas formulações no tratamento preventivo da doença.

Finalmente, nanopartículas lipídicas, como nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs), oferecem outra alternativa terapêutica para administração controlada de medicamentos. Essas nanopartículas têm um núcleo hidrofóbico composto de lipídios sólidos à temperatura ambiente e são cercadas por uma camada estabilizadora formada por surfactantes anfifílicos ou co-surfactantes (Nemattalab *et al.*, 2022). Conforme relatado por Nemattalab *et al.* (2022), *Cinnamomum verum* (óleo de canela) é amplamente utilizado como um agente antibacteriano natural e, quando encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs), tende a exibir

atividade aprimorada devido aos efeitos promissores de transporte dessa terapia farmacológica. Em seu estudo, nanopartículas contendo óleo de canela foram preparadas usando o método de dupla emulsão, seguido pela avaliação do tamanho da partícula, forma, eficiência de encapsulamento, cinética de liberação de óleo e compatibilidade celular. A atividade nanotecnológica foi então investigada contra 10 cepas de *E. coli* resistentes a medicamentos. Os dados apresentados indicam que a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo encapsulado foi significativamente reduzida, sugerindo que o sistema facilitou, promoveu e aumentou a eficácia do óleo na penetração da membrana celular bacteriana. Portanto, seguindo essa abordagem, pode-se concluir que esse sistema contendo óleo de canela pode ser uma alternativa potencial promissora para o tratamento de doenças inflamatórias em gado leiteiro.

No contexto abordado, este projeto baseia-se no desenvolvimento, caracterização e funcionalização de sistemas lipídicos nanoestruturados biodegradáveis e biocompatíveis contendo óleo essencial de orégano com potencial atividade antimicrobiana frente às cepas patogênicas causadoras da mastite bovina no rebanho leiteiro.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, otimizar e caracterizar nanossistemas funcionalizados do tipo Carreador Lipídico Nanoestruturado (CLNs) contendo óleo essencial de orégano para avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante frente a espécies de bactérias patogênicas associadas a mastite em gado leiteiro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o óleo essencial de orégano por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM);
- Promover estudos de pré-formulação de carreadores lipídicos nanoestruturados;
- Desenvolver e otimizar nanossistemas lipídicos associados ao óleo essencial de orégano através do uso do planejamento experimental do tipo *Box-Behnken*;
- Realizar a funcionalização dos nanossistemas otimizados com polietilenoglicol (PEG), colesterol e Pluronic[®] F-68;
- Determinar as características físico-químicas dos compostos isolados e dos nanossistemas obtidos através das análises de tamanho, índice de polidispersão (PdI), potencial Zeta (PZ), espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), termogravimetria (TGA/DSC), difração de raio-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Realizar estudos de doseamento e eficiência de encapsulação;
- Determinar a estabilidade dos nanossistemas sob armazenamento à diferentes temperaturas;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do óleo essencial de orégano nanoencapsulado;
- Avaliar a atividade antibacteriana das formulações através da concentração inibitória mínima (CIM) e da curva de morte de espécies de bactérias patogênicas associadas a mastite bovina.

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) foi adquirido da Ferquima Indústria e Comércio (São Paulo, Brasil) e o Triglicerídeo de Cadeia Média (MCT) da Basf Pharma (Califórnia, Estados Unidos). Precirol® ATO 5 foi adquirido da Gattefossé (Nova Jersey, Estados Unidos), Lipoid® S-100 foi comprado na (Renânia-Palatinado, Alemanha). Colesterol foi comprado da Dishman (Veenendaal, Holanda). A quitosana 15 kDa foi obtida da Polysciences, Inc. (Pensilvânia, Estados Unidos). O polietilenoglicol (PEG) 6000 PA foi adquirido da Dinâmica Química Contemporânea® (São Paulo, Brasil). Polaxamer 188 (Pluronic® F68), Polissorbato 80 (Tween® 80), Monoesterato de Sorbitan (Span® 60) e comprimidos de solução salina tamponada com fosfato (PBS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil). Cloreto de metileno (Diclorometano – DCM) adquirido da Nova Cinética Ltda, (São Paulo, Brasil). Ácido acético glacial P.A. adquirido por Clavikko Comercio Industrial LTDA (Sabará, Minas Gerais). Água ultrapura foi gentilmente fornecida pela Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da Universidade Federal da Paraíba. Todos os materiais foram utilizados conforme recebidos.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO

O óleo essencial de orégano foi analisado por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) utilizando um Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas modelo CGMS- QP2010 Ultra, equipado com coluna capilar RTX-5MS (5% difenil/95% dimetil polissiloxano), tamanho 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Shimadzu®, Kyoto, Japão). O volume de injeção das amostras foi de 1 µL com uma razão de split de 1:150. O hélio foi usado como gás de arraste a uma taxa de 1 mL/min. A temperatura de entrada da amostra foi de 300 °C e a temperatura do injetor foi mantida em 280 °C. A temperatura inicial do forno foi programada para 100 °C, mantida por 5 minutos, e depois aumentada para 280 °C a uma taxa de 10 °C/minuto. Esta temperatura foi aplicada a 70 eV, com uma varredura completa em uma faixa de massa de 35-400 m/z (Uchôa *et al.*, 2025). Todos os dados cromatográficos foram processados com o software GC-MS da Shimadzu (GCMS solution) e OpenChrom®.

4.3 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS

4.3.1 Efeito de Composição

Os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLNs) foram produzidos e avaliados mediante testes de interação entre diferentes componentes e óleo essencial de orégano através do método de emulsificação a quente seguida de sonicação. Estudos comparativos foram realizados visando obter carreadores lipídicos monodispersos, que assegurem a compactação ideal do núcleo de óleo e a estabilidade do nanossistema. Portanto, Cera de Abelha (GM Ceras[®]), behenato de glicerilo (Compritol[®] 888 CG ATO) e diesterato de glicerila (Precirol[®] ATO 5) (1,5%) foram utilizados como lipídios sólidos; monoesterato de sorbitano 60 (Span[®] 60) e fosfatidilcolina (Lipoid[®] S-100) (0,5% e 1%) como tensoativos lipofílicos; e polaxamer 188 (Pluronic[®] F68) e polissorbato 80 (Tween[®] 80) (0,5% e 1%) como tensoativos hidrofílicos. O lipídio líquido utilizado em todas as formulações foi o óleo essencial de orégano (1,5%) (Gundogdu *et al.*, 2022).

4.3.2 Efeito do Processo de Produção

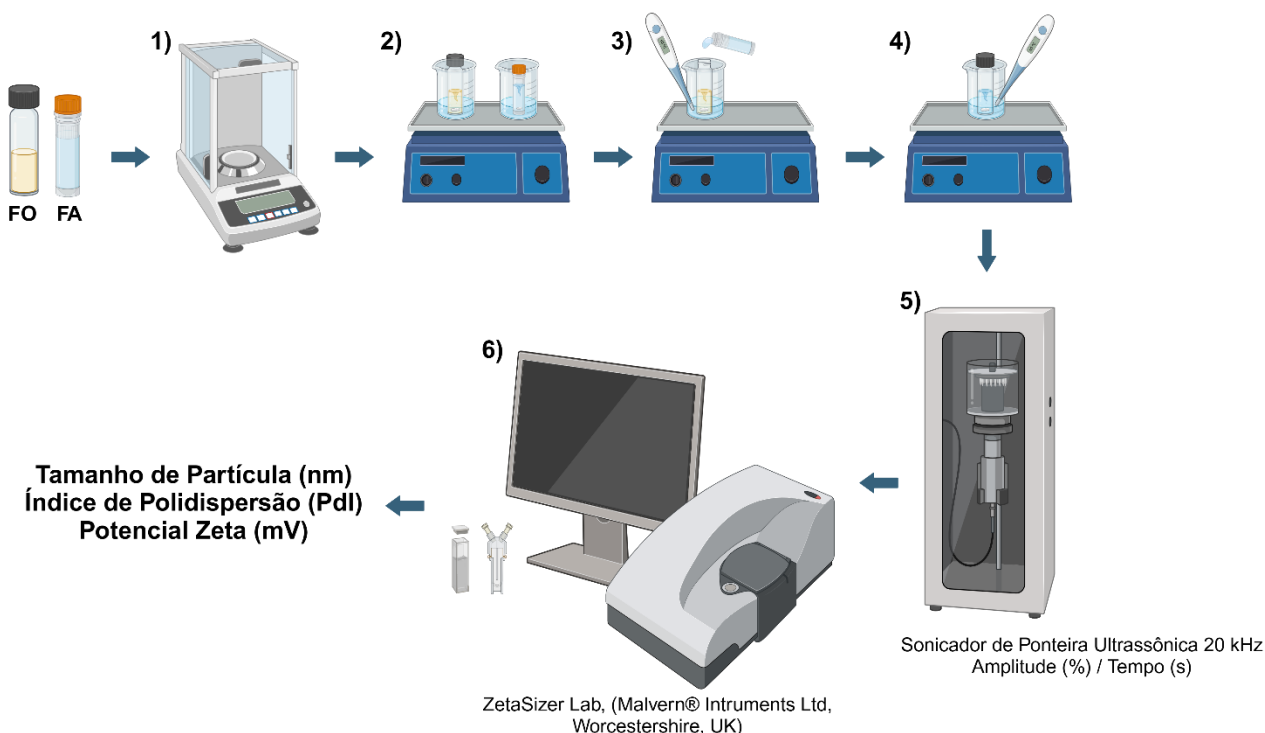
O estudo estimou padronizar os parâmetros de sonicação, como amplitude e tempo, no processo de emulsificação a quente. Assim, foi avaliado a influência do tempo (30-180 segundos) e da amplitude de potência (40-80 W) enquanto parâmetros fundamentais, utilizando o Desruptor de Células/Sonicador de Ponteira Ultrassônica (Sonicador Ultrassônico 20 kHz - Ultronique[®], Indaiatuba, São Paulo, Brasil) com capacidade máxima de 500 watts. A influência dos parâmetros de sonicação foi analisada considerando alterações de tamanho, índice de polidispersão e carga de superfície das partículas (Song; Lin; Li, 2022).

4.4 PRODUÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS PELO MÉTODO DE EMULSIFICAÇÃO A QUENTE SEGUIDO DE SONICAÇÃO

Para a produção dos CLNs, com base no estudo de pré-formulação, foi definido para compor a fase oleosa, cera de abelha (1,5%) como lipídio sólido, óleo essencial de orégano (1,5%) como lipídio líquido e Span[®] 60 (1%) como tensoativo lipofílico; ao passo que, na fase aquosa, o Tween[®] 80 (0,5%) foi definido como tensoativo hidrofílico e, como solvente de dispersão, foi ajustado o volume final de água ultra purificada em 1 mL. Para isso, as amostras foram pesadas e submetidas à agitação magnética (1.000 rpm) sob aquecimento em banho-maria (65-70 °C) (SPLabor[®], São Paulo, Brasil) e, subsequentemente, à homogeneização em um Desruptor de Células/Sonicador de Ponteira Ultrassônica (20 kHz) (Ultronique[®], Indaiatuba, São Paulo, Brasil) com amplitude de 80% e tempo de 30 segundos, a fim de promover o cisalhamento capaz de reduzir as partículas em escala nanométrica. Todos os nanossistemas

produzidos foram armazenados em recipientes de vidro e mantidos a 25 °C até as análises de caracterização (**Figura 6**).

Figura 6. Representação esquemática do processo de produção dos CLNs



Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por Biorender.com. Legenda: 1- Pesagem dos componentes da fase orgânica (FO) e fase aquosa (FA) separadamente. 2- Inserção das fases na placa de aquecimento e agitação magnética. 3- A fase aquosa é vertida na fase orgânica. 4- Homogeneização do nanossistema para formação das nanopartículas. 5- Após homogeneização, a formulação é levada ao Sonicador de Ponteira Ultrassônica para redução das partículas na escala nanométrica através da força de cisalhamento 6- Análise das formulações no ZetaSizer Lab, de acordo com as características de tamanho (nm), índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta (mV).

4.5 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO EXPERIMENTAL DO TIPO *BOX-BEHNKEN*

O planejamento experimental do tipo *Box-Behnken*, com três pontos centrais, representativos da triplicata experimental, foi realizado a fim de otimizar a produção do CLN. Quinze formulações diferentes foram produzidas, com as concentrações de lipídio líquido (OEO; 1%, 3% e 5%), lipídio sólido (Cera de Abelha; 1%, 3,5% e 6%) e tensoativo hidrofílico (Tween® 80; 1%, 2% e 3%) utilizadas como variáveis independentes, ao passo que o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas e o potencial Zeta foram atribuídos como variáveis dependentes. A concentração do tensoativo lipofílico (Span® 60) permaneceu constante (2%). Os carreadores foram produzidos conforme descrito anteriormente, através da técnica de emulsificação a quente seguido de sonicação (Baldim *et al.*, 2022). Todas as análises e a

construção representativa de diagramas e gráficos 3D foram realizadas por meio do software Statistica® (StatSoft®, versão 12.0) para avaliar a influência dos componentes na variação dos valores de tamanho e carga de superfície.

4.6 OTIMIZAÇÃO DOS NANOSSISTEMAS PRODUZIDOS CONFORME BOX-BEHNKEN

Os nanossistemas foram otimizados de acordo com o planejamento experimental do tipo *Box-Behnken* considerando os resultados da análise do tamanho médio das partículas (nm), carga de superfície (Potencial Zeta, mV) e da interação entre esses parâmetros. A otimização desenvolvida com foco na redução do tamanho médio das partículas foi composta por cera de abelha (1%), óleo essencial de orégano (1%) e Tween® 80 (3%) (oCLN1). Para melhorar a carga de superfície, a composição incluiu cera de abelha (2,25%), óleo essencial de orégano (1%) e Tween® 80 (3%) (oCLN2). Já a formulação otimizada considerando a interação entre tamanho e potencial Zeta foi obtida com cera de abelha (1%), óleo essencial de orégano (5%) e Tween® 80 (1%) (oCLN3). Os carreadores foram produzidos conforme descrito anteriormente, utilizando a técnica de emulsificação a quente seguido de sonicação. Todas as formulações foram submetidos a análises caracterização físico-química de tamanho (nm), PDI e PZ (mV).

4.7 FUNCIONALIZAÇÃO DO NANOSSISTEMA OTIMIZADO

O nanossistema otimizado foi submetido à modificação de superfície com componentes biocompatíveis, objetivando modular sua interação e seu direcionamento para células-alvo. Portanto, polietilenoglicol (PEG) e Pluronic® F-68 foram adicionados à fase aquosa das formulações, ao passo que colesterol foi adicionado à fase oleosa, todos em diferentes concentrações (0,05; 0,10; 0,15 e 0,20%). Os efeitos da funcionalização foram avaliados a partir dos resultados de tamanho das partículas (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta (mV). Todas as amostras foram mantidas a 25 °C e analisadas posteriormente.

4.8 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

4.8.1 Análise do tamanho de partícula

O diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersão (PDI) das partículas foram determinados pela técnica de dispersão de luz dinâmica, ou Dynamic Light Scattering (DLS) (Zetasizer LAB – Malvern® Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido) a 25 °C. O ângulo de espalhamento foi fixado em 90 graus, e as amostras foram diluídas, em cubetas DTS0012,

na proporção de 1:100 com água Milli-Q[®] antes da análise. Os resultados analisados em triplicata foram expressos como diâmetro hidrodinâmico médio (nm) (tamanho das partículas) e índice de polidispersão (PdI), sendo apresentados como média $\pm$ desvio padrão (Zeta Plus[®] Particle Sizing, versão 3.95).

4.8.2 Potencial Zeta

O potencial Zeta (ζ) indica a carga de superfície das partículas e foi determinado pela técnica de dispersão de luz eletroforética, ou Electrophoretic Light Scattering (ELS) (Zetasizer LAB – Malvern[®] Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido) a 25 °C. A amostra foi colocada em uma célula capilar (DTS1070) com dois eletrodos, onde um campo elétrico é aplicado, estimulando o deslocamento das partículas carregadas em direção ao eletrodo de carga oposta, sendo a sua velocidade proporcional à carga. As amostras foram diluídas (1:100) com água Milli-Q[®] e o ângulo de espalhamento foi fixado em 13 graus. Os resultados foram analisados em triplicata e os dados expostos como média $\pm$ desvio padrão (Zeta Plus[®] Particle Sizing, versão 3.95).

4.8.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras (oCLN, oCLN-PEG, oCLN-Col e oCLN-Plu) foram conduzidas no óleo essencial de orégano, em todos os componentes individuais e nas formulações finais produzidas pelo espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier modelo Agilent Cary 630 FTIR (Agilent, Santa Clara, Califórnia), através de reflectância total atenuada (ATR) (FTIR-ATR, Shimadzu[®] Cary 630). Os dados foram coletados na região de 4000 a 650 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e 128 varreduras.

4.8.4 Análise Morfológica: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para avaliação da morfologia das nanopartículas, foi utilizada a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para preparação das amostras, as dispersões foram diluídas em uma proporção de 1:10, e 5 μ L da diluição foram depositados em uma lâmina fixa em um *Stub* contendo fita de carbono. As amostras foram secas em um dessecador, metalizada com ouro usando um metalizador DESK II (Denton Vacuum) e analisado usando MEV (TESCAN, MIRA3) com um acelerador de voltagem de 20 kV trabalhando a uma distância de 15 milímetros.

4.8.5 Análise de Difração de Raio-X (DRX)

A análise de DRX (Difração de Raios-X de Ângulo Amplo) (Bruker D8 Advance, Bruker, Alemanha) foi realizada com uma velocidade de varredura de $2^\circ/\text{min}$, na faixa de $2\theta = 3,00\text{--}40,00^\circ$. A fonte de raios-X foi um anodo de Cu de 2,2 kW (40 kV, 40 mA, radiação Cu-K, $\lambda = 0,15406\text{ nm}$). Antes da medição, as amostras de CLNs foram liofilizadas para evaporar a água. O lipídio em massa foi analisado sem nenhum tratamento prévio.

4.8.6 Análises Térmicas

As análises térmicas foram conduzidas para avaliar a estabilidade térmica dos carreadores nanoestruturados à base de lipídios. A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada usando uma termobalança Hitachi STA7300 (Chiyoda, Tóquio, Japão), enquanto a calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada com DSC25 da TA Instruments (New Castle, Delaware, Estados Unidos). Para ambas as técnicas, as amostras foram colocadas em cadinhos de platina e submetidas a um protocolo de aquecimento controlado de 20°C à 800°C , com uma taxa de aquecimento de $20^\circ\text{C}/\text{min}$, sob uma atmosfera de nitrogênio com vazão de $50\text{ mL}/\text{min}$.

4.9 DOSEAMENTO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE%)

De modo a assegurar a quantificação de óleo essencial de orégano encapsulado nos carreadores lipídicos, o doseamento e a eficiência de encapsulação (EE%) foram determinados a partir da produção de curvas de calibração, que se deu através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Diante disto, alíquotas de óleo foram preparados nas concentrações 1, 5, 10, 15 e $20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ e injetados no sistema. Para a análise, foi utilizada uma fase móvel composta por metanol e água na proporção 80:20 v/v, a qual foi filtrada e degaseificada antes do uso, a fim de garantir o grau de pureza e evitar a formação de bolhas no sistema. Uma coluna C18 ($250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$) foi usada, e o detector UV foi configurado para um comprimento de onda de 276 nm . A taxa de fluxo foi ajustada para $1,4\text{ mL}/\text{min}$ e o volume de injeção no aparelho foi de $20\text{ }\mu\text{L}$ de amostra. Os cromatogramas resultantes foram analisados para obter as áreas dos picos correspondentes a cada concentração.

O teor de óleo na solução preparada foi quantificado diluindo as amostras em metanol em tubos Eppendorf® de 1 mL , os quais foram deixados em banho ultrassônico a 45°C por 20 minutos e, posteriormente, centrifugados (14.000 rpm , 5 minutos) (Centrífuga 5430,

Eppendorf[®], Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi coletado, filtrado em 0,22 µm e analisado conforme descrito anteriormente. Já a EE% foi determinada através da ultrafiltração, utilizando filtros de tubos de centrífuga Corning[®] Costar[®] Spin-X[®] com capacidade de 500 µL. Para tanto, as amostras foram centrifugadas (5.000 rpm, 15 minutos), e o filtrado foi coletado. EE% foi calculado através da **Equação 1**:

$$EE\% = \left(\frac{\text{Total do composto adicionado} - \text{composto filtrado}}{\text{Total do composto adicionado}} \right) \times 100 \quad (1)$$

4.10 ESTUDO DE ESTABILIDADE DOS NANOSSISTEMAS

As formulações foram submetidas a análises de estabilidade a curto prazo sob temperatura controlada. Os CLNs foram armazenados em frascos hermeticamente selados e avaliados durante 60 dias, à temperatura de geladeira (4 °C), temperatura de bancada (25 °C) e temperatura de estufa (37 °C), em termos de tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta, conforme descrito anteriormente.

4.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

A capacidade antioxidante foi determinada pelos métodos DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), FRAP (poder antioxidante redutor férrico) e ABTS (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzoatiazolina)-6-sulfônico). As medições de absorbância para os métodos foram realizados com um espectrofotômetro de microplacas (BioTek Eon, Winooski, VT, EUA) nos respectivos comprimentos de onda de 515, 595 e 734 nm (Silva *et al.*, 2023).

4.11.1 Capacidade antioxidante *in vitro* – método DPPH

Avaliação da capacidade de eliminação do radical DPPH foi avalida conforme Silva *et al.* (2023). Para isso, foi elaborada uma solução de DPPH• (2,4 mg diluído em 100 mL de álcool metílico absoluto). Subsequentemente, preparou-se também uma solução padrão de Trolox a 2 mM (25 mg em 50 mL de álcool etílico absoluto) como referência.

Para a análise, foram elaboradas diferentes diluições das formulações e do óleo essencial puro, onde retiraram-se 50 µL de cada uma e acrescentaram-se 250 µL da solução de DPPH•. Em seguida, a mistura foi mantida sob repouso por 30 minutos em temperatura ambiente (25 ± 0,5 °C) no escuro. O controle foi a mistura da solução extratora (50 µL) e solução de DPPH• (250 µL). Para o branco foi utilizado apenas a solução extratora (300 µL). Com isso, foi realizada a leitura em comprimento de onda de 515 nm usando um

espectrofotômetro BioTek Eon (Winooski, VT, USA), para medir a diminuição na concentração do radical livre DPPH•. A atividade antioxidante foi calculada a partir da % Inibição da amostra (%I), o valor de *Trolox Equivalente Antioxidant Capacity* (TEAC) em μM para amostra foi obtido da equação da curva de padrão Trolox e, a partir da **Equação 2** foi obtido o valor final do TEAC ($\mu\text{mol/g}$ de amostra).

$$\text{TEAC } (\mu\text{mol/g amostra}) = \frac{\text{TEAC } (\mu\text{M})}{[\text{Amostra}] (\text{g/mL})} \quad (2)$$

Onde, “TEAC (μM)” é o valor obtido da equação da curva padrão trolox para o %I da amostra, e, “[Amostra] (g/mL)” é a concentração da amostra utilizada no ensaio.

4.11.2 Capacidade antioxidante *in vitro* – método FRAP

O poder antioxidante para a redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} no ensaio de FRAP foi avaliado de acordo com Paula *et al.* (2022), com pequenas modificações. O reagente FRAP foi preparado somente no momento da análise, utilizando uma mistura de 5 mL de tampão acetato (0,3M, pH 3,6), 0,5 mL de solução TPTZ 10 mM e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico a 20 mM, na proporção 10:1:1, respectivamente.

Para a análise foram elaboradas diferentes diluições das formulações e do óleo essencial puro, onde retiraram-se 20 μL de cada uma e acrescentaram-se 30 μL de água destilada, seguido da adição de 250 μL do reagente FRAP. A mistura foi incubada em banho termostatzado (Splabor®) a $37 \pm 0,5$ °C por 30 minutos no escuro.

A solução “branca” foi o próprio reagente FRAP. Foi realizada a leitura em comprimento de onda de 595 nm usando um espectrofotômetro BioTek Eon (Winooski, VT, USA), para medir a redução do complexo TPTZ com Fe^{3+} . A atividade antioxidante foi calculada usando uma curva de sulfato ferroso a 2 mM como referência. Os resultados foram expressos em μmol de equivalentes de sulfato ferroso por g de amostra ($\mu\text{mol/g}$).

4.11.3 Capacidade antioxidante *in vitro* - Método ABTS•⁺

A capacidade antioxidante equivalente a trolox por meio da captura do radical ABTS•⁺ foi avaliada conforme Nascimento *et al.* (2022), com algumas modificações. O radical ABTS•⁺ foi formado por meio da reação da solução ABTS⁺ a 7 mM com a solução de persulfato de potássio a 140 mM, que foram incubados em temperatura de 25 ± 1 °C no escuro durante 16

horas. Após a formação do radical, foi realizada a diluição em álcool etílico absoluto até obter o valor de absorbância de $0,70 \pm 0,05$ nm a 734 nm.

Para a análise, foram elaboradas diferentes diluições das formulações e do óleo essencial puro, onde transferiram-se 50 µL de cada diluição em uma microplaca de 96 poços e acrescentaram-se 250 µL do radical ABTS^{•+}. O controle foi a mistura da solução extratora (50 µL) e o radical ABTS^{•+} (250 µL). Para o branco foi utilizada apenas a solução extratora (300 µL). As amostras foram mantidas na ausência de luz por 6 minutos e realizada a leitura da absorbância em comprimento de onda de 734 nm, usando espectrofotômetro BioTek Eon (Winooski, VT, USA) para medir a diminuição na concentração do radical livre ABTS^{•+}. A atividade antioxidante foi calculada a partir da % Inibição da amostra (%I), o valor de *Trolox Equivalente Antioxidant Capacity* (TEAC) em µM para amostra foi obtido da equação da curva de padrão Trolox e, a partir da **Equação 3** foi obtido o valor final do TEAC (µmol/g de amostra).

$$\text{TEAC } (\mu\text{mol/g amostra}) = \frac{\text{TEAC } (\mu\text{M})}{[\text{Amostra}](\text{g/mL})} \quad (3)$$

Onde, “TEAC (µm)” é o valor obtido da equação da curva padrão trolox para o %I da amostra, e, “[Amostra] (g/mL)” é a concentração da amostra utilizada no ensaio.

4.12 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO

Quatro cepas bacterianas diferentes, isoladas de animais bovinos com mastite leiteira, codificadas como *Staphylococcus aureus* 700, *Escherichia coli* 843, *Staphylococcus coagulase-negativa* 1118 (SNA 1118) e 1108 (SNA 1108), foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva do Hospital Veterinário Universitário do CCA/UFPB (Campus II – Areia, Paraíba).

As culturas em estoque foram mantidas em Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI; HiMedia, Mumbai, Índia) com glicerol (15 g/100 mL) a -20 °C. As culturas de trabalho foram mantidas em ágar BHI sob refrigeração (5 ± 1 °C) e transferidos para um novo meio mensalmente. Para a preparação do inóculo usado nos experimentos, uma alça da cultura de trabalho de cada cepa foi ressuspensa em 5 mL de caldo BHI e incubada *overnight* a 37 ± 1 °C. Posteriormente, a leitura da densidade óptica em 625 nm da cultura foi ajustada para, aproximadamente, 0,2, sendo equivalente a contagens de células viáveis de 7 – 8 log Unidades Formadora de Colônia por mililitro (UFC/mL).

4.13 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de orégano puro e das formulações encapsuladas com o OEO (oCLN, oCLN-Col, oCLN-PEG e oCLN-Plu) frente a *S. aureus* 700, SNA 1118, SNA 1108 e *E. coli* 843 foi determinada através do método de microdiluição em caldo, conforme adaptado da metodologia de Sidiropoulou *et al.* (2022).

Alíquotas de 100 µL do óleo essencial puro e das formulações contendo OEO com concentração final de 10 mg/mL foram adicionadas à microplaca de 96 poços e diluídas em 50 µL de caldo BHI e, em seguida, alíquotas de 100 µL foram transferidas para os poços seguintes por meio de diluições geométricas, e, por fim, uma alíquota de 50 µL da cepa teste foi adicionada a cada poço. As concentrações finais das formulações variaram de 0,05 a 2,88 mg/mL. Cada placa incluiu um conjunto de controles positivos (caldo BHI com inóculo da cepa de teste) e negativos (caldo BHI não inoculado com a cepa teste e sem formulação adicionada). A microplaca foi incubada a 37 ± 1 °C por 24h. Ao término do período de incubação, a CIM foi considerada como sendo a menor concentração onde não houve crescimento visível das cepas testadas.

4.14 CINÉTICA DE CRESCIMENTO

A cinética de crescimento das culturas patogênicas foi monitorada por meio da contagem de células viáveis no tempo 0 (imediatamente após a inoculação), 1, 2, 4, 8, 12, 24 e 48 horas de incubação. Para isso, foi homogeneizado em caldo BHI cada formulação (CIM), seguida da inoculação bacteriana na proporção de 11:100 µL. Uma alíquota de 100 µL foi removida de cada meio de cultura contendo as cepas patogênicas, em cada período determinado, e realizado a sua adição em tubos Eppendorfs® contendo água peptonada. Diluições seriadas foram realizadas (1:9 v/v, 10^{-1} – 10^{-7}) e, posteriormente, uma alíquota de 10 µL de cada diluição foi retirada e inoculada em placas de petri contendo ágar BHI, sendo incubadas a 37 ± 1 °C por 48h. Os resultados foram expressos como log UFC/mL.

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas em média das réplicas e os resultados expressos como médias $\pm$ desvio padrão. Os resultados do planejamento experimental foram comparados usando análise de variância (ANOVA), permitindo a determinação da significância das variáveis e das interações entre elas. Modelos de regressão, testes T e testes F foram utilizados, e um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os softwares GraphPad Prism® versão 8.0.2 (Califórnia, Estados Unidos), Statistica® versão

12.0 (StatSoft[®], Inc., Estados Unidos) e Sigma Stat[®] versão 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA) foram usados para a análise dos dados.

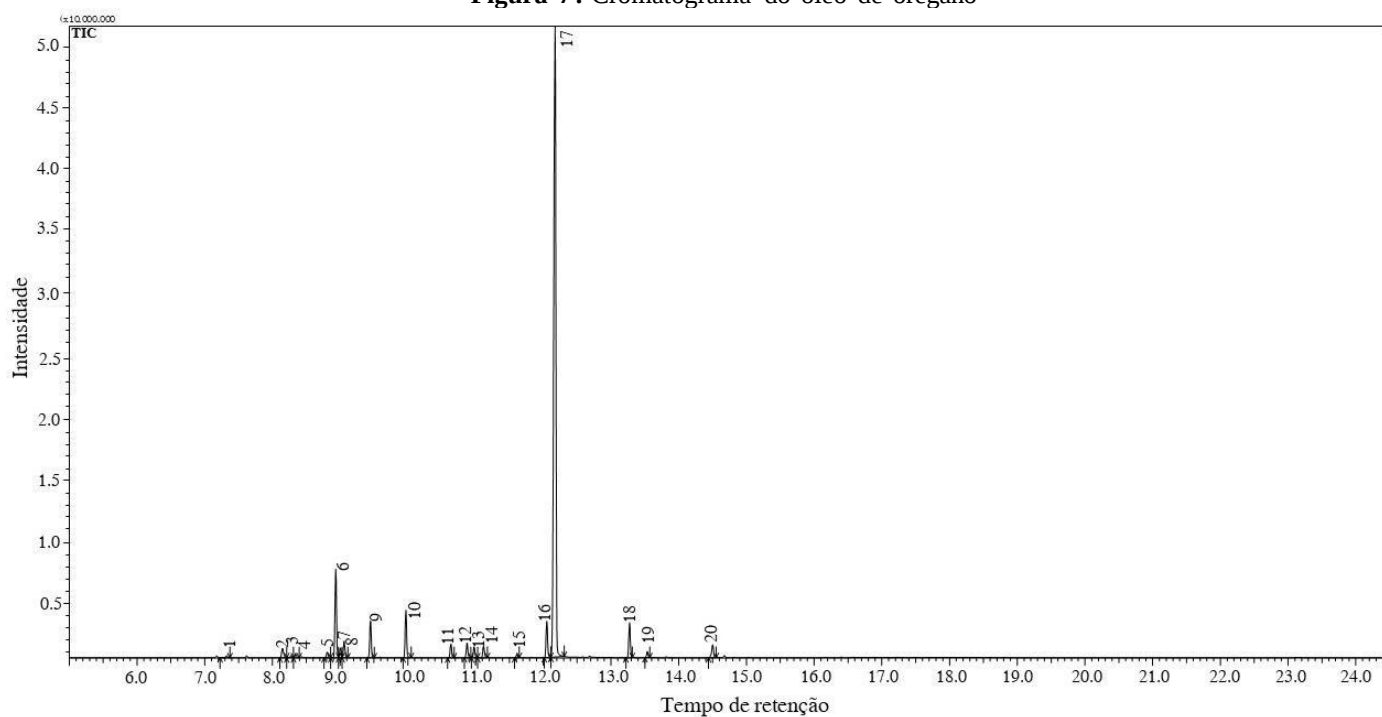
Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO

O óleo essencial de orégano foi caracterizado pela técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). O óleo exibiu um cromatograma com picos bem definidos e separados (**Figura 7**). Entre os principais compostos, foram encontrados Carvacrol (70,1%), o-cimol (7,1%) e linalol (3,7%), conforme representado na **Tabela 1**.

Figura 7. Cromatograma do óleo de orégano



Fonte: Próprio autor, 2025.

Tabela 1. Componentes encontrados no óleo de orégano por CG-EM: Identificação do pico, tempo de retenção (min), porcentagem relativa a área e a relação massa carga (m/z)

Pico	Tempo de retenção (min)	Área	Área (%)	Componente	Base m/z
1	7.324	315310	0.20	α -pineno	93.10
2	8.148	1451187	0.91	β -Pineno	57.05
3	8.275	328213	0.20	3-octanona	43.05
4	8.345	471638	0.48	β -mirceno	41.05
5	8.809	770275	0.48	α -terpineno	93.10
6	8.934	11297920	7.06	o-cimol	119.10
7	9.003	1336147	0.83	2-Borneno	68.10
8	9.058	2191562	1.37	1,8-cineol	43.05
9	9.447	4675441	2.92	γ -terpineno	93.10
10	9.970	5866069	3.66	Linalol	71.05
11	10.635	1817379	1.13	-(-)alcanfora	95.10
12	10.874	1916437	1.20	Bornéol	95.10
13	10.978	1407839	0.88	(-)-Terpinen-4-ol	71.05
14	11.117	1632739	1.02	α -acetato de terpinila	59.05
15	11.610	416849	0.26	Éter timolmetílico	149.15
16	12.051	4780579	2.99	o-acetiltimol	135.10
17	12.173	112186556	70.06	Carvacrol	135.15
18	13.274	4415193	2.76	β -cariofileno	69.10
19	13.537	819407	0.51	α -humuleno	93.10
20	14.501	1035575	1.27	β -epóxido de cariofileno	43.05
		160132315	100.00		

Fonte: Próprio autor, 2025.

A composição do óleo essencial de orégano observada através da análise por CG-EM identificou 20 compostos representando 100% do óleo total. Os picos expostos revelaram a correlação com a presença de compostos fitoquímicos, principalmente monoterpenos e terpenoides, fato que corrobora com os achados na literatura de Tejada- Muñoz *et al.* (2024).

Diferentes perfis químicos puderam ser encontrados na composição do óleo essencial de orégano, como o carvacrol (70,1%), o-acetiltimol (3,0%) e γ -terpineno (2,9%). Este último é derivado do geranyl pirofosfato (GPP), um intermediário-chave na síntese de monoterpenos e precursor da via dos terpenoides, especificamente da via do mevalonato em plantas e na via do 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato em bactérias. Sua formação ocorre a partir do p-cimeno ou do terpinen-4-ol, composto intermediário para a produção de compostos fenólicos como timol e carvacrol, presentes no óleo essencial de orégano, cuja composição pode variar de acordo com diversos fatores (Kaur *et al.*, 2023).

Apesar da literatura explicitar o timol como marcador presente no óleo essencial de orégano, no cromatograma referente a **Tabela 1** não é possível identificar o pico correspondente

ao composto. Entretanto, pode-se observar a presença do o-acetiltimol (acetato de timil) em pequenas concentrações no *Origanum vulgare* L. e em outras espécies da família, o qual, em sua forma acetilada, tende a reduzir a toxicidade e aumentar os efeitos biológicos deste monoterpene (Jyoti *et al.*, 2019).

Concomitante aos estudos encontrados na literatura, os resultados obtidos por meio do cromatograma confirmam o papel do óleo essencial de orégano como adjuvante terapêutico, pois a presença desses compostos confere efeitos antimicrobianos modulares e sinérgicos, atividades antioxidantes analgésicas, anticancerígenas e anti-inflamatórias (Kamenova *et al.*, 2024; Saoudi *et al.*, 2024).

5.2 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

5.2.1 Efeito dos Lipídios Sólidos na composição dos CLNs

Para avaliar o lipídio sólido e sua composição proporcional ao nanossistema, foi utilizado uma variação entre cera de abelha, behenato de glicerilo (Compritol[®] 888 CG ATO) e diesterato de glicerila (Precirol[®] ATO 5) (1,5%) como lipídios sólidos, óleo essencial de orégano (1,5%) como lipídio líquido, à medida que, como tensoativos lipofílico e hidrofílico, foi definido, respectivamente, monoesterato de sorbitano 60 (Span[®] 60) e polissorbato 80 (Tween[®] 80) (0,5% e 1%), conforme exposto na **Tabela 2**.

Tabela 2. Resultados da caracterização físico-química dos carreadores mediante a variação de lipídio sólido

Formulação	Concentração dos componentes (%)				Solvente (µL)	Tamanho (nm)	PdI	PZ (mV)
	Cera de Abelha	OEO	Span	Tween	Água			
CLN 1	1,5	1,5	0,05	0,05	960	269,7 ± 7,5	0,29 ± 0,04	-28,2 ± 0,6
CLN 2	1,5	1,5	0,10	0,10	950	250,8 ± 3,1	0,38 ± 0,01	-26,2 ± 1,1
CLN 3	1,5	1,5	0,10	0,05	955	254,1 ± 1,1	0,28 ± 0,01	-28,4 ± 0,6
CLN 4	1,5	1,5	0,05	0,10	955	217,4 ± 2,6	0,44 ± 0,05	-25,6 ± 1,3
Formulação	Compritol	OEO	Span	Tween	Água	Tamanho (nm)	PdI	PZ (mV)
CLN 5	1,5	1,5	0,05	0,05	960	281,6 ± 12,3	0,38 ± 0,02	-35,8 ± 2,8
CLN 6	1,5	1,5	0,10	0,10	950	280,9 ± 4,1	0,28 ± 0,03	-31,9 ± 0,9
CLN 7	1,5	1,5	0,10	0,05	955	268,2 ± 5,3	0,32 ± 0,04	-33,4 ± 0,7
CLN 8	1,5	1,5	0,05	0,10	955	308,9 ± 12,7	0,33 ± 0,02	-33,0 ± 0,8
Formulação	Precirol	OEO	Span	Tween	Água	Tamanho (nm)	PdI	PZ (mV)
CLN 9	1,5	1,5	0,05	0,05	960	275,3 ± 12,3	0,40 ± 0,01	-28,8 ± 1,8
CLN 10	1,5	1,5	0,10	0,10	950	298,1 ± 4,0	0,41 ± 0,02	-28,2 ± 0,5
CLN 11	1,5	1,5	0,10	0,05	955	409,5 ± 11,2	0,44 ± 0,04	-32,3 ± 2,5
CLN 12	1,5	1,5	0,05	0,10	955	241,8 ± 5,3	0,47 ± 0,12	-28,6 ± 3,3

Fonte: Próprio autor, 2025. **Dados da pesquisa:** Parâmetros de sonicação (60%, 70 segundos). Legenda: CLN: Carreador lipídico nanoestruturado. Lipídios sólidos: cera de abelha, Compritol[®] 888 CG ATO e Precirol[®] ATO 5. Lipídio líquido: óleo essencial de orégano (OEO). Tensoativo lipofílico: Span[®] 60. Tensoativo hidrofílico: Tween[®] 80. PdI: índice de polidispersão; PZ: potencial Zeta (mV).

Dentre os lipídios sólidos avaliados, a cera de abelha apresentou menores valores de tamanho de partícula e índice de polidispersão (PdI) nas formulações testadas, conforme observado na **Tabela 2**. Neste contexto, a formulação CLN 3, composta por cera de abelha (1,5%), óleo essencial de orégano (1,5%), Span[®] 60 (1%) e Tween[®] 80 (0,5%), apresentou tamanho de partícula de 254,1 ± 1,1 nm, PdI de 0,28 ± 0,01 e potencial Zeta de -28,4 ± 0,6 mV. Esses resultados contrastam com as formulações CLN 7 e CLN 11, compostas, respectivamente, por Compritol[®] 888 CG ATO e Precirol[®] ATO 5 como lipídios sólidos. Apesar das mesmas proporções dos componentes utilizados, exibiram tamanho de partícula de 268,2 ± 5,3 e 409,5 ± 11,2 nm, PdI 0,32 ± 0,04 e 0,44 ± 0,04 e PZ de -33,4 ± 0,7 e -32,3 ± 2,5 mV, respectivamente.

Tendo em vista que a dificuldade medicamentosa em adentrar a circulação sistêmica se dá devido a inúmeros fatores correlacionados, à exemplo da baixa solubilidade e absorção do medicamento, o rápido efeito de primeira passagem – o que impacta em uma biodisponibilidade limitada -, além de oscilações da concentração plasmática e da interação

com a dieta (Avula *et al.*, 2023). A caracterização de partículas nanotecnológicas é imprescindível para garantir a produção de sistemas coloidais estáveis e com parâmetros primordiais para otimização da eficácia de um ativo ou de um medicamento nanoencapsulado (Kenechukwu *et al.*, 2022). Neste sentido, estimando-se obter uma aplicabilidade eficiente de administração transdérmica, o tamanho das partículas é um ponto crucial, pois visa a interação da formulação com os seus componentes moleculares e com a barreira epidérmica (Avula *et al.*, 2023).

É inquestionável que o tamanho médio das partículas nos sistemas lipídicos depende de sua produção e composição, uma vez que isso pode estar correlacionado ao processo de fusão e de solidificação durante o processo produtivo do carreador lipídico nanoestruturado (Khan *et al.*, 2024). Além disso, apesar da amplitude e do tempo de sonicação a que os carreadores são submetidos, os fatores mencionados anteriormente tendem a ser resistentes aos parâmetros de cisalhamento da sonda, sendo capazes de minimizar a redução das partículas em escala nanométrica (Khan *et al.*, 2024; Apostolou *et al.*, 2021).

De maneira geral, CLNs tendem a ser sistemas nanométricos na faixa de tamanho abaixo de 1000 nm (Khan; Sharma; Jain, 2022). Somado a isso, estudos relatam que partículas com tamanho de 100 nm são capazes de penetrar as camadas mais profundas da pele, ao passo que partículas com tamanho de 300 nm tendem a atingir as camadas mais superficiais (Santonocito; Puglia, 2025). Em suma, partículas menores tendem a apresentar um efeito positivo na penetração transdérmica do fármaco nanoencapsulado. Este fato correlaciona ao entendimento de que quanto menor a partícula, maior a sua área interfacial e, com isso, melhor a permeabilidade do ativo (Akombaetwa *et al.*, 2023).

O índice de polidispersão (PdI) é um parâmetro físico-químico que indica a homogeneidade de um nanossistema. Sistemas coloidais mais homogêneos, consequentemente, monodispersos, tendem a apresentar maior estabilidade a longo prazo, reduzindo a formação de agregados lipídicos (Santana *et al.*, 2023; Alamoudi *et al.*, 2024). Neste contexto, a literatura relata que o índice de polidispersão de um sistema produzido e caracterizado para fins comerciais deve estimar valores $\leq 0,25$ (Uchôa *et al.*, 2025). Todavia, outros autores afirmam que valores $\leq 0,30$ ainda caracterizam um sistema monodisperso e menos propenso à agregação (Correia *et al.*, 2024). É importante pontuar que a representação numérica do PdI varia entre 0,00 e 1,00, valores acima de 0,70 sugerem uma ampla distribuição das partículas, resultando em sistemas polidispersos com maior tamanho médio e menor estabilidade (Uchôa *et al.*, 2025).

O potencial Zeta (ζ) é outro parâmetro físico-químico que avalia a estabilidade das

formulações com base na diferença da carga entre a superfície das partículas e a carga na região de cisalhamento da dupla camada final de Stern, que pode ser exposta de maneira positiva, negativa ou neutra, a depender dos constituintes utilizados em sua composição (Musielak; Feliczak-Guzik; Nowak, 2022; Németh *et al.*, 2022). Em resumo, ele mensura a carga da partícula ou sua repulsão eletrostática em milivolts (mV), estimando a eficácia das nanopartículas na interação com sistemas biológicos (Musielak; Feliczak-Guzik; Nowak, 2022). Em sistemas coloidais, a estabilidade resulta do equilíbrio entre as forças atrativas de van der Waals e as interações repulsivas da dupla camada elétrica, conforme a teoria DLVO (teoria de Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) (Yang; Wen, 2022; Agmo Hernández, 2023). Nesta perspectiva, potenciais Zeta elevados ($>|20|$ mV) favorecem a repulsão eletrostática, reduzindo a agregação, prevenindo a floculação e aumentando a estabilidade coloidal (Németh *et al.*, 2022).

Corroborando aos parâmetros mencionados anteriormente, a cera de abelha se destaca como um produto natural capaz de atribuir o efeito oclusivo na pele. Ou seja, trata-se de um ativo com propriedades benéficas na barreira cutânea semi-oclusiva, reduzindo a perda de água transepidérmica e retendo a hidratação, somado a sua capacidade emoliente, o que reduz a presença de sintomas associados a doenças de pele, à exemplo da mastite (Joukhadar *et al.*, 2024). Diante dos resultados observados, do custo reduzido e de se tratar de um produto natural, foi definido a cera de abelha como lipídio sólido utilizado no nanossistema alvo do estudo.

5.2.2 Efeitos dos tensoativos na composição dos CLNs

Definido o lipídio sólido utilizado no nanossistema, deu-se seguimento ao estudo de pré-formulação com testes experimentais relacionados a variação dos tensoativos lipofílicos e hidrofílicos. Desta forma, foi utilizado cera de abelha (GM Ceras[®]) (1,5%) como lipídio sólido, óleo essencial de orégano (1,5%) como lipídio líquido e uma variação de tensoativos, sendo, respectivamente, monoesterato de sorbitano 60 (Span[®] 60) e fosfatidilcolina (Lipoid[®] S-100) os tensoativos lipofílicos e polissorbato 80 (Tween[®] 80) e polaxamer 188 (Pluronic[®] F-68) como hidrofílicos (0,5% e 1%), conforme exposto na **Tabela 3**.

Tabela 3. Resultados da caracterização físico-química dos carreadores mediante a variação dos tensoativos lipofílicos e hidrofílicos

Formulação	Concentração dos Componentes (%)				Solvente (μL)	Tamanho (nm)	Pdl	PZ (mV)
	Cera	OEO	Span® 60	Tween® 80	Água			
CLNST1	1,5	1,5	0,05	0,05	960	269,7 ± 7,5	0,29 ± 0,04	-28,2 ± 0,6
CLNST2	1,5	1,5	0,10	0,10	950	250,8 ± 3,1	0,38 ± 0,01	-26,2 ± 1,1
CLNST3	1,5	1,5	0,10	0,05	955	254,1 ± 1,1	0,28 ± 0,01	-28,4 ± 0,6
CLNST4	1,5	1,5	0,05	0,10	955	217,4 ± 2,6	0,44 ± 0,05	-25,6 ± 1,3
Formulação	Cera	OEO	Lipoid®	Tween® 80	Água	Tamanho (nm)	Pdl	PZ (mV)
CLNLT1	1,5	1,5	0,05	0,05	960	483,3 ± 7,0	0,59 ± 0,10	-26,1 ± 0,5
CLNLT2	1,5	1,5	0,10	0,10	950	538,5 ± 6,5	0,78 ± 0,15	-24,6 ± 0,7
CLNLT3	1,5	1,5	0,10	0,05	955	767,2 ± 22,0	0,79 ± 0,04	-25,8 ± 1,0
CLNLT4	1,5	1,5	0,05	0,10	955	376,6 ± 55,0	0,48 ± 0,01	-25,7 ± 0,6
Formulação	Cera	OEO	Span® 60	Pluronic®	Água	Tamanho (nm)	Pdl	PZ (mV)
CLNSP1	1,5	1,5	0,05	0,05	960	308,7 ± 12,1	0,43 ± 0,05	-35,0 ± 0,7
CLNSP2	1,5	1,5	0,10	0,10	950	282,9 ± 8,3	0,38 ± 0,02	-30,3 ± 1,0
CLNSP3	1,5	1,5	0,10	0,05	955	353,4 ± 7,8	0,35 ± 0,06	-31,0 ± 1,1
CLNSP4	1,5	1,5	0,05	0,10	955	383,2 ± 27,9	0,55 ± 0,05	-30,7 ± 1,0

Próprio autor, 2025. **Dados da pesquisa:** Parâmetros de sonicação (60%, 70 segundos). Legenda: CLNST: Carreador lipídico nanoestruturado contendo Span® 60 e Tween® 80. CLNLT: Carreador lipídico nanoestruturado contendo Lipoid® S100 e Tween® 80. CLNSP: Carreador lipídico nanoestruturado contendo Span® 60 e Pluronic® F-68. Lipídio sólido: cera de abelha. Lipídio líquido: óleo essencial de orégano (OEO). Tensoativos lipofílicos: Span® 60 e Lipoid® S100. Tensoativos hidrofílicos: Tween® 80 e Pluronic® F-68. Pdl: índice de polidispersão; PZ: potencial Zeta (mV).

Ao observar os resultados dos tensoativos lipofílicos e hidrofílicos, Span® 60 e Tween® 80 apresentaram os menores valores de tamanho de partícula e índice de polidispersão, conforme observado na **Tabela 3**. Diante disso, a formulação CLNST3, composta por cera de abelha (1,5%), óleo essencial de orégano (1,5%), Span® 60 (1%) e Tween® 80 (0,5%), obteve os melhores resultados de tamanho de partícula 254,1 ± 1,1 nm, Pdl de 0,28 ± 0,01 e PZ de -28,4 ± 0,6 mV. Diferentemente do que pode ser observado nas formulações CLNLT3 e CLNSP3, compostas, respectivamente, por Lipoid® S-100 e Tween® 80 e Span® 60 e Pluronic® F-68 como tensoativos. Mesmo diante as mesmas proporções dos componentes utilizados, apresentaram tamanho de partícula de 767,2 ± 22,0 e 353,4 ± 7,8, Pdl 0,79 ± 0,04 e

$0,35 \pm 0,06$ e PZ de $-25,8 \pm 1,0$ e $-31,0 \pm 1,1$ mV, respectivamente.

A literatura descreve o estudo experimental de Unissa *et al.* (2023) sobre a seleção dos surfactantes que serão incorporados em carreadores lipídicos visando a realização de ensaios farmacológicos. Os autores observaram que o uso de Polaxamer 188 (Pluronic[®] F-68) e Polissorbato 80 (Tween[®] 80) influenciou diretamente a morfologia das partículas. Conforme análise microscópica, as partículas formuladas com Pluronic[®] F-68 apresentaram formato aproximadamente esférico e alta tendência à formação de agregados lipídicos. Em contraste, aqueles contendo Tween[®] 80 exibiram formato mais regular e menor propensão à agregação, proporcionando uma melhor estabilidade estrutural, com tamanho de partícula entre $118,4 \pm 5,94$ e $294,8 \pm 2,49$ nm, atribuindo os menores resultados ao aumento da concentração do tensoativo.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os achados da literatura sobre a influência dos tensoativos na estabilidade e no tamanho das partículas. A formulação contendo Pluronic[®] F-68 apresentou maiores diâmetros médios ($282,9 \pm 8,3$ a $383,2 \pm 27,9$ nm) e índices de polidispersão ($0,35 \pm 0,06$ a $0,55 \pm 0,05$). Em contrapartida, a substituição desse tensoativo pelo Tween[®] 80 resultou em partículas menores ($217,4 \pm 2,6$ e $269,7 \pm 7,5$ nm) e um PDI limitado ($0,28 \pm 0,01$ e $0,44 \pm 0,05$). Considerando que a literatura recomenda, para aplicação tópica, partículas com diâmetro inferior a 300 nm e PDI abaixo de 0,30 (Uchôa *et al.*, 2025; Németh *et al.*, 2022), os resultados indicam que a formulação com Tween[®] 80 se encontra dentro dos parâmetros físico-químicos adequados para carreadores lipídicos. Em relação ao potencial Zeta, não foi possível estabelecer um critério comparativo definitivo para determinar o melhor tensoativo hidrofílico. O Pluronic[®] F-68 apresentou valores superiores a -30 mV, enquanto o Tween[®] 80 obteve valores acima de -25 mV, embora inferiores aos obtidos com o Pluronic[®].

A literatura descreve o Pluronic[®] como um copolímero aniônico com capacidade de automontagem em meio aquoso, conferindo-lhe propriedades hidrofílicas devido à presença de grupos hidroxila e carboxila, caracterizando a carga terapêutica negativa em nanossistemas particulados (Takegawa *et al.*, 2025; Khaliq *et al.*, 2023). Em contrapartida, o Tween[®] 80 é um surfactante não iônico com elevada capacidade de adsorção em superfícies oleosas, promovendo a redução da tensão interfacial e prevenindo a agregação lipídica (Laosinwattana *et al.*, 2025). Dessa forma, a escolha do tensoativo não foi examinada em variações significativas que pudessem ser justificadas através da carga de superfície.

O Lipoid[®] S100 é uma lecitina de soja composta exclusivamente por fosfatidilcolina, um fosfolipídio de membrana que contribui para o aumento da eficiência de encapsulamento de fármacos em matrizes lipídicas, reduzindo o vazamento dos componentes (De Souza *et al.*, 2020).

Esse composto anfílico possui propriedades que favorecem a biodisponibilidade do fármaco e sua interação em fluídos biológicos (Harasym; Banaś, 2024). Todavia, o monoesterato de sorbitano (Span[®] 60) é um surfactante lipofílico formado por ésteres de sorbitol e ácidos graxos, caracterizado pela sua elevada em sistemas óleo-em-água (O/A) e água-em-óleo (A/O), aspecto essencial para o armazenamento de dispersões coloidais (Bharti *et al.*, 2022; Zheng; Zheng; Zhu., 2022).

Considerando a influência dos surfactantes lipofílicos, os resultados deste estudo destacam parâmetros relevantes para a obtenção de transportadores lipídicos estáveis e com menor tendência à agregação lipídica. A formulação contendo Tween[®] 80 como tensoativo hidrofílico e Span[®] 60 como tensoativo lipofílico apresentou menores diâmetros médios ($217,4 \pm 2,6$ e $269,7 \pm 7,5$ nm) e índices de polidispersão ($0,28 \pm 0,01$ e $0,44 \pm 0,05$). Esse comportamento pode ser atribuído à composição estrutural dos grupos ésteres e ácidos graxos, que conferem ao sistema uma estrutura amorfa, facilitando a compactação do material lipídico. Esse fato aprimora a eficácia do encapsulamento do ativo e resultando em uma dispersão mais homogênea (Bharti *et al.*, 2022).

Por outro lado, a substituição do Span[®] 60 por Lipoid[®] S100 resultou em partículas com diâmetros entre $376,6 \pm 55,0$ e $767,2 \pm 22,0$ nm, além de PdIs variando de $0,48 \pm 0,01$ e $0,79 \pm 0,04$, indicando menor heterogeneidade. Esse comportamento pode ser atribuído à maior densidade do tensoativo, caracterizado pela sua elevada temperatura de fusão, o que favorece a solidificação e reduz o movimento browniano das partículas. Quanto ao potencial Zeta, não foi possível estabelecer um critério comparativo definitivo para determinar o tensoativo lipofílico mais adequado, pois não foram observadas diferenças significativas na carga de superficial das partículas.

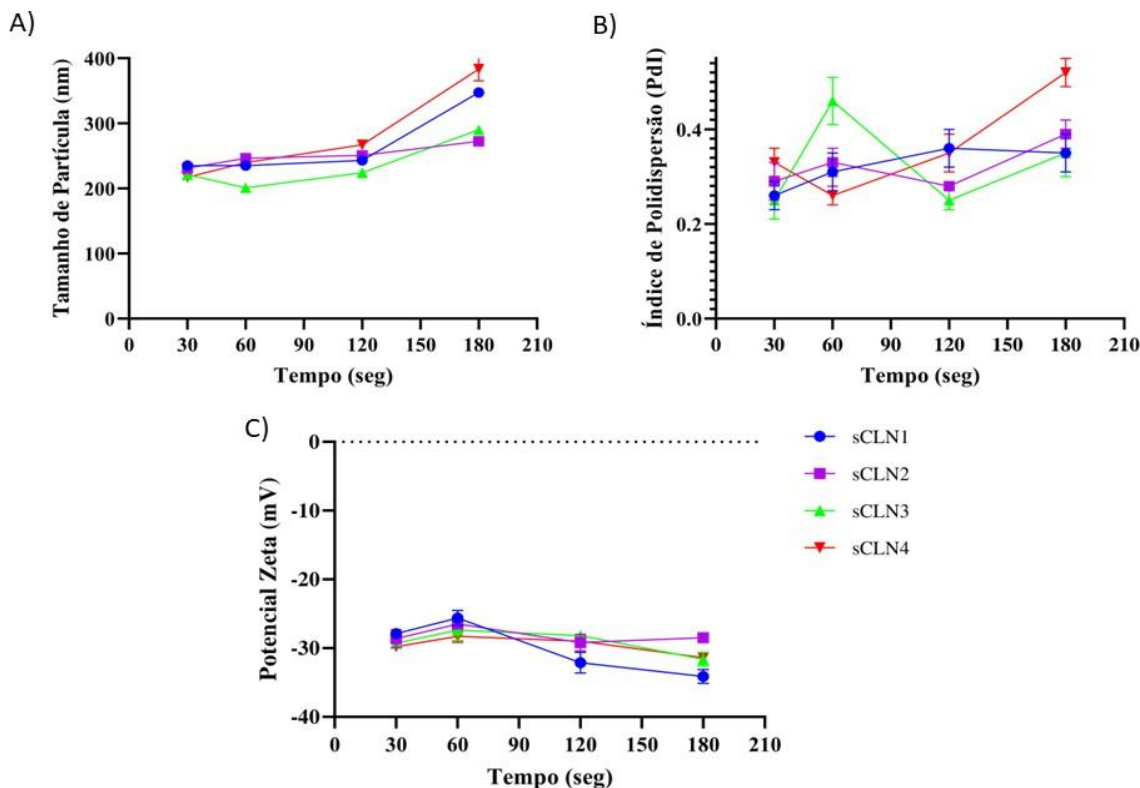
Diante dos resultados observados, foi definido o Monoesterato de Sorbitano (Span[®] 60) como tensoativo lipofílico e o Polissorbato 80 (Tween[®] 80) como tensoativo hidrofílico para compor o nanossistema do presente estudo.

5.3 EFEITO DOS PARÂMETROS DE PRODUÇÃO DOS CLNS

5.3.1 Tempo de Sonicação

Durante o processo de produção, utilizou-se o sonicador ultrassônico para avaliar a influência do tempo de sonicação, variando entre 30 e 180 segundos. Através desse processo, foi possível analisar o impacto da sonicação no tamanho das partículas (nm), no índice de polidispersão (PdI) e no potencial Zeta (mV), conforme demonstrado na **Figura 8**.

Figura 8. Efeito da variação do tempo de sonicação nos parâmetros de tamanho das partículas (nm) (A), índice de polidispersão (B) e potencial Zeta (mV) (C)



Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por GraphPad Prism[®]. Legenda: sCLN: Carreador lipídico nanoestruturado avaliado conforme a influência do tempo de sonicação no sonicador de ponteira ultrassônica.

Os resultados obtidos indicaram que a formulação sCLN3, quando submetida à sonicação por 60 segundos, apresentou o menor tamanho de partícula ($201,3 \pm 0,9$ nm). No entanto, essa mesma formulação exibiu um índice de polidispersão elevado ($0,46 \pm 0,05$), ultrapassando o limite de 0,30 recomendado para partículas monodispersas. Diante disso, considerando as características físico-químicas de tamanho (nm) e índice de polidispersão (PdI), as formulações produzidas apresentaram melhores resultados quando submetidas a um tempo de sonicação menor, especificamente de 30 segundos.

Sendo assim, com 30 segundos de sonicação, as formulações contendo diferentes concentrações de surfactantes lipofílicos e hidrofílicos, apresentaram tamanho de partícula entre $217,2 \pm 0,7$ e $235,3 \pm 4,0$ nm; PdI entre $0,25 \pm 0,04$ e $0,33 \pm 0,03$ e potencial Zeta (PZ) variando de $-28,6 \pm 1,3$ a $-29,8 \pm 0,7$ mV. Em contraste, ao aumentar o tempo de sonicação para 180 segundos, nas mesmas concentrações, observou-se um aumento no tamanho das partículas ($272,4 \pm 5,9$ a $383,6 \pm 18,1$ nm); no PdI ($0,35 \pm 0,04$ a $0,52 \pm 0,03$) e variação no PZ ($-28,5 \pm 0,6$ e $-34,1 \pm 1,0$ mV).

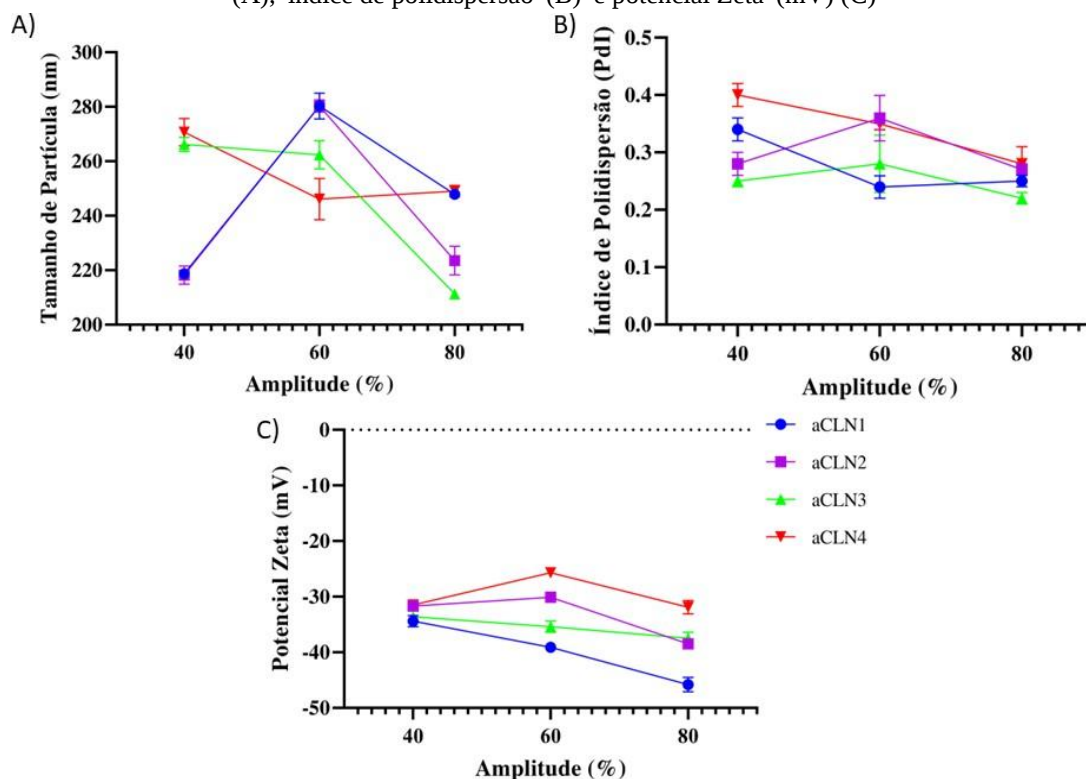
De forma concisa, conforme descrito por Bukke *et al.* (2024), a aplicação de energia ultrassônica em dispersões coloidais, como os carreadores lipídicos nanoestruturados, promove

a fragmentação de gotículas maiores em menores, resultando em partículas de menor tamanho médio. Contudo, a literatura indica que esse efeito depende da composição lipídica do nanossistema, e, nesse contexto, o efeito inverso também pode ocorrer (Ajiboye *et al.*, 2021). Ou seja, a extensão do tempo de sonicação pode não apenas aumentar o tamanho das partículas, mas também induzir a degradação lipídica (Bukke *et al.*, 2024). Esse fenômeno pode estar relacionado à coalescência de partículas menores, que, devido à elevada energia de cisalhamento, não conseguem ser fragmentadas em dimensões ainda menores (Ajiboye *et al.*, 2021). Com base na análise dos resultados obtidos, determinou-se que o tempo de sonicação de 30 segundos foi o mais adequado para os nanossistemas produzidos, proporcionando melhores parâmetros em relação ao tamanho das partículas (nm), índice de polidispersão (PdI) e potencial Zeta (mV).

5.3.2 Amplitude de Sonicação

Após definir o tempo de sonicação, foi avaliado a variação da amplitude de sonicação entre 40 e 80%, onde, diante dele, será possível avaliar a influência deste parâmetro nos resultados de tamanho das partículas (nm), índice de polidispersão (PdI) e potencial Zeta (mV), conforme demonstra a **Figura 9**.

Figura 9. Efeito da variação da amplitude de sonicação nos parâmetros de tamanho das partículas (nm) (A), índice de polidispersão (B) e potencial Zeta (mV) (C)



Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por GraphPad Prism®. Legenda: aCLN: Carreador lipídico nanoestruturado avaliado conforme a influência da amplitude de sonicação no sonicador de ponteira ultrassônica.

Os resultados obtidos das formulações, quando submetidas a uma potência de sonicação de 40%, apresentou valores de tamanho de partícula entre $218,2 \pm 3,3$, e $270,7 \pm 5,0$ nm; PDI entre $0,25 \pm 0,01$ e $0,4 \pm 0,02$ e potencial Zeta variando de $-31,5 \pm 0,9$ a $-34,4 \pm 1,0$ mV. Por outro lado, em uma potência aplicada de 60%, apresentaram resultados de tamanho variando de $246,1 \pm 7,6$ a $280,3 \pm 4,8$ nm; PDI de $0,24 \pm 0,02$ a $0,36 \pm 0,04$ e PZ entre $-25,7$ e $-39,1 \pm 0,4$ mV. Por fim, na maior potência de sonicação testada (80%), foram obtidos um valor médio de tamanho entre $211,3 \pm 1,9$ e $249,0 \pm 2,1$ nm; PDI entre $0,22 \pm 0,01$ e $0,28 \pm 0,03$ e PZ de $-31,9 \pm 1,2$ a $-45,8 \pm 1,3$ mV.

Diante disso, observou-se que partículas produzidas em menor potência de sonicação (40%) apresentaram maior índice de polidispersão e menor carga de superfície. Além disso, quando em 60% de sonicação, as formulações apresentaram os maiores resultados de tamanho de partícula e elevadas variações no PDI. Finalmente, com 80% de potência, todas as formulações exibiram menores tamanhos e índices de polidispersão, mostrando uma exibição entre os parâmetros comparativos. Ademais, as partículas obtidas nessa condição revelaram melhores resultados de carga superficial, indicando uma maior estabilidade ao longo do tempo.

Esses achados podem ser justificados através das condições operacionais do equipamento. Durante o processo de produção, o sonicador de ponteira ultrassônica (também conhecido como disruptor de células) emite ondas ultrassônicas de alta frequência que se propagam através do meio líquido, gerando pressões e vibrações mecânicas na amostra (Zhu *et al.*, 2024). Esse fenômeno leva à cavitação acústica, na qual microbolhas colapsam, liberando energia significativa (Low *et al.*, 2022). Como resultado, ocorre a movimentação intensa do meio, com a geração de ondas mecânicas e microcorrentes, promovendo a fragmentação das partículas em tamanhos menores (Shen *et al.*, 2023).

Nesse contexto, o maior tempo, a maior amplitude e a maior pressão de sonicação favorecem as partículas de menor tamanho, devido às intensas forças de cisalhamento geradas pelo equipamento (Low *et al.*, 2022). No entanto, esse parâmetro pode variar conforme os componentes utilizados para composição do carreador, uma vez que certos materiais podem sofrer degradabilidade durante o processo produtivo (Zabot; Viganó; Silva, 2021).

Assim, considerando estes fatos e o tempo de sonicação pré-definido de 30 segundos, os resultados obtidos apresentaram melhores parâmetros de caracterização físico-química com a amplitude do equipamento ajustada para 80% na produção do nanossistema. Com isso, a formulação aCLN3 apresentou melhores valores de tamanho ($211,3 \pm 1,9$ nm), índice de polidispersão ($0,22 \pm 0,01$) e potencial Zeta ($-37,5 \pm 1,1$ mV), conforme relatado na literatura, sendo estes dentro dos parâmetros estabelecidos no que tange a uma aplicabilidade tópica.

5.4 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO EXPERIMENTAL DO TIPO *BOX-BEHNKEN*

O planejamento experimental do tipo *Box-Behnken* resultou em 15 formulações do tipo carreador lipídico nanoestruturado com aparência macroscópica branca leitosa característico de coloides. Diante dos resultados obtidos experimentalmente, as formulações produzidas obtiveram tamanho médio de partícula entre $138,1 \pm 2,2$ e $302,3 \pm 6,7$ nm, PDI entre $0,15 \pm 0,01$ e $0,54 \pm 0,02$ e PZ entre $-21,5 \pm 0,04$ e $-49,5 \pm 1,7$ mV (**Tabela 4**).

Desta forma, o design experimental (DOE) foi realizado com base nas análises do diagrama de Pareto, gráficos de superfície de resposta, limites de confiabilidade, valores observados vs. valores previstos e perfis para valores previstos e desejabilidade, a fim de identificar os efeitos da influência das variáveis independentes e suas interações para obtenção dos resultados de tamanho das partículas e potencial Zeta.

Tabela 4. Planejamento experimental do tipo *Box-Behnken* para otimização dos carreadores lipídicos com diferentes concentrações de lipídios e tensoativo hidrofílico

Formulações	Concentrações dos Componentes (mg)			Tamanho (nm)	PDI	PZ (mV)
	Cera de Abelha	OEO	Tween 80			
1	10	30	10	$201,6 \pm 4,1$	$0,24 \pm 0,02$	$-43,8 \pm 1,2$
2	60	10	20	$196,4 \pm 3,2$	$0,19 \pm 0,01$	$-33,2 \pm 0,9$
3	10	30	30	$197,2 \pm 4,9$	$0,43 \pm 0,07$	$-38,2 \pm 0,4$
4	35	30	20	$229,4 \pm 1,2$	$0,42 \pm 0,03$	$-23,5 \pm 0,7$
5	35	30	20	$230,5 \pm 9,5$	$0,54 \pm 0,02$	$-21,5 \pm 0,4$
6	60	50	20	$241,2 \pm 0,7$	$0,46 \pm 0,03$	$-40,3 \pm 1,0$
7	35	30	20	$236,2 \pm 4,2$	$0,29 \pm 0,03$	$-24,8 \pm 0,4$
8	10	10	20	$141,0 \pm 4,0$	$0,32 \pm 0,03$	$-34,8 \pm 3,6$
9	35	50	10	$201,3 \pm 3,6$	$0,17 \pm 0,03$	$-49,5 \pm 1,7$
10	60	30	10	$211,5 \pm 5,7$	$0,20 \pm 0,08$	$-39,5 \pm 0,5$
11	10	50	20	$196,0 \pm 1,4$	$0,41 \pm 0,05$	$-37,1 \pm 0,5$
12	35	10	10	$241,3 \pm 5,7$	$0,27 \pm 0,01$	$-38,2 \pm 0,8$
13	60	30	30	$243,2 \pm 3,1$	$0,28 \pm 0,02$	$-34,2 \pm 0,8$
14	35	10	30	$138,1 \pm 3,2$	$0,15 \pm 0,01$	$-25,7 \pm 1,0$
15	35	50	30	$302,3 \pm 6,7$	$0,31 \pm 0,12$	$-41,4 \pm 0,2$

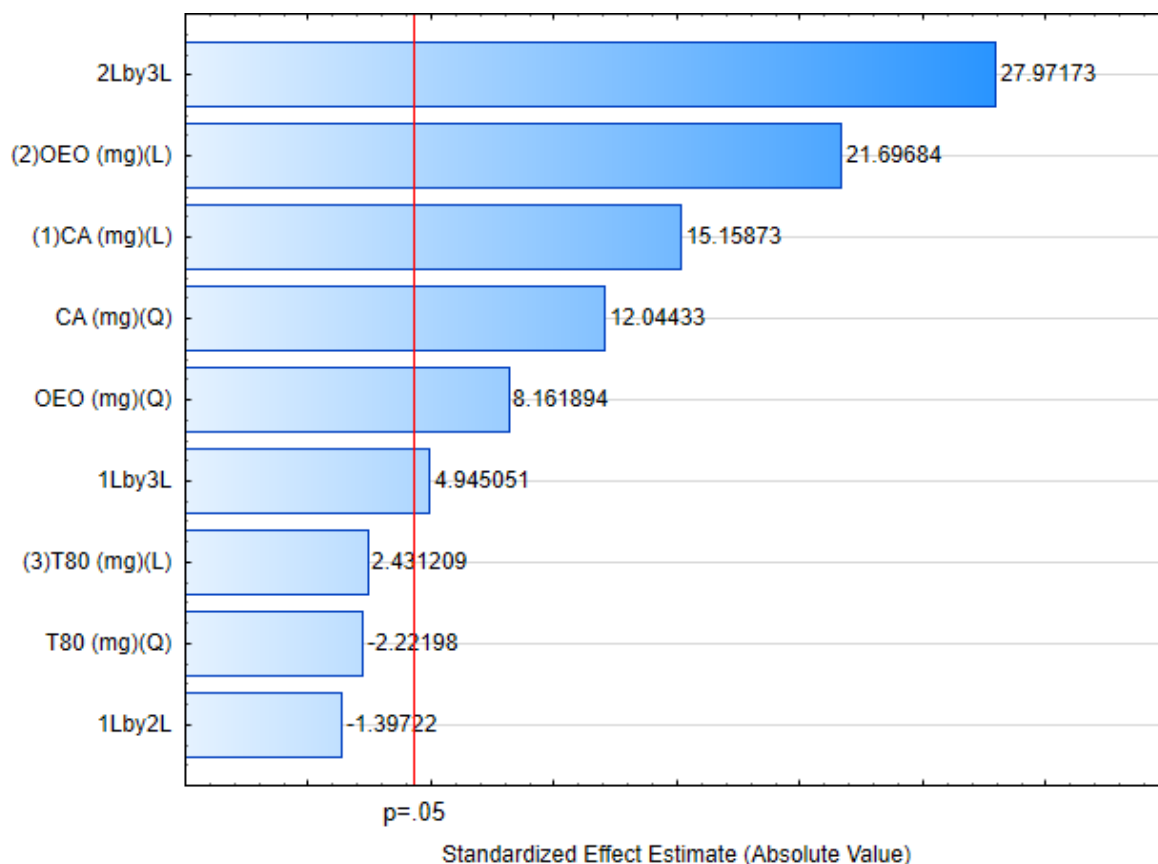
Fonte: Próprio autor, 2025. *O valor de Span® 60, utilizado como tensoativo lipofílico, foi padronizado em 20 mg para todas as formulações produzidas. Legenda: Lipídio sólido: cera de abelha. Lipídio líquido: óleo essencial de orégano (OEO). Tensoativo lipofílico: Span® 60. Tensoativo hidrofílico: Tween® 80. PDI: índice de polidispersão; PZ: potencial Zeta (mV).

Inicialmente, a análise do diagrama de Pareto permitiu identificar as variáveis estatisticamente significativas no tamanho das partículas durante a produção dos CLNs (**Figura 10**), fornecendo valores lineares (L) e quadráticos (Q) para as interações. Segundo Uchôa e colaboradores (2025), interações lineares representam a correlação direta de duas variáveis, incluindo um impacto proporcional na resposta. Já as interações quadráticas possibilitam a modelagem da curvatura na superfície de resposta, abrangendo não apenas os termos quadráticos das variáveis, mas também os termos de interação.

A qualidade do ajuste do modelo proposto foi avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2), que mostra um nível de confiança na probabilidade de valores previstos vs observados. A matriz foi considerada estatisticamente significativa ($R^2=0,9804$), tendo 98,0% de variabilidade na variável de resposta. Além disso, a alta significância do modelo foi confirmada pelo valor do coeficiente de determinação ajustado ($\text{Adj } R^2=0,9451$), garantindo um alto nível de fidelidade aos dados explorados.

Conforme relata Abas *et al.* (2023), o gráfico de Pareto é composto por barras expressas indicativas do efeito das variáveis independentes – seja de forma individual dos componentes, seja através da interação bidirecional entre dois componentes – e sua resposta, atribuída como variável dependente, à medida que os valores apresentados à direita correspondem aos efeitos favoráveis ou não à resposta esperada. No que tange a isto, se o valor atribuído àquela resposta for positivo, isto torna-se um indicativo de que a variável em questão tende a contribuir para o aumento do tamanho da partícula. Em contraponto, se negativo, ele tende a impactar na redução de tal parâmetro. Outro ponto a ser observado no gráfico é a presença de uma linha de referência em vermelho, indicando que, variáveis que cruzam esta linha podem ser consideradas parâmetros significativos ao delineamento experimental.

Figura 10. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis independentes conforme os resultados de tamanho das partículas



Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por Statistica® (StatSoft®, versão 12.0). Legenda: OEO: óleo essencial de orégano, CA: cera de abelha. T80: Tween® 80.

Considerando cada uma das variáveis apresentadas no diagrama de Pareto, o óleo essencial de orégano, cera de abelha e Tween® 80 demonstraram ser variáveis independentes do estudo que obtiveram um efeito significativo na produção de CLN. cera de abelha e óleo essencial de orégano (L e Q) demonstraram um maior efeito no aumento do tamanho das partículas, ao passo que a interação de Tween® 80 (L) com OEO (L) e cera de abelha (L) também demonstraram um efeito positivo para o aumento do tamanho das partículas. Em contrapartida, Tween® 80 (L e Q) e a interação de cera de abelha (L) com OEO (L) não ofereceram efeito significativo para a produção dos carreadores.

Estudos indicam que concentrações elevadas de lipídios sólidos, especialmente aquelas com altos pontos de fusão, como a cera de abelha, resultam em um aumento do diâmetro das partículas devido à maior interferência ao sistema, comprometendo a homogeneidade e a estabilidade do nanossistema (Subramaniam; Siddik; Nagoor, 2020; Viegas *et al.*, 2023). Esse efeito justifica o impacto positivo da cera de abelha no aumento do tamanho das partículas.

Por outro lado, estudos de Sonar *et al.* (2023) indicam concentrações elevadas de óleo essencial de orégano podem levar ao aumento do tamanho das partículas. De maneira semelhante,

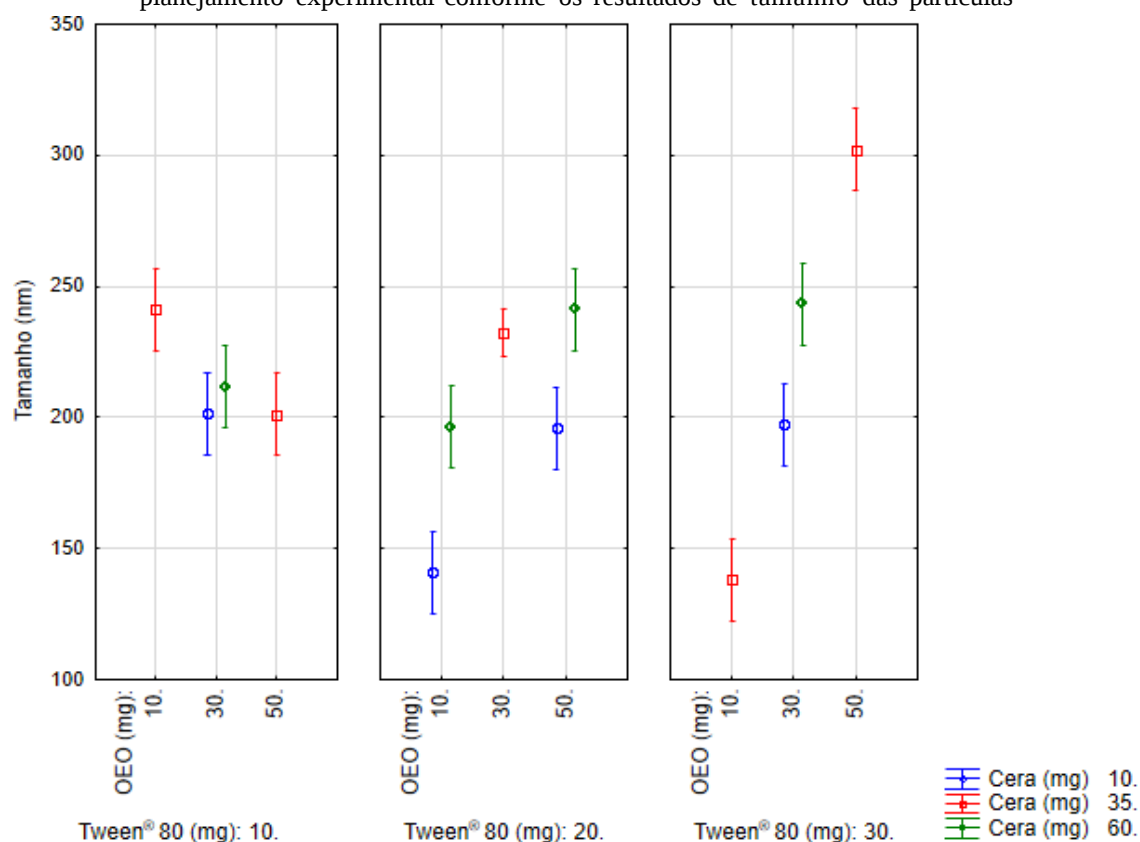
uma pesquisa desenvolvida por Aguilar-Pérez *et al.* (2021) avaliou a produção de lipossomas contendo OEO e observou que partículas de menor tamanho foram inicialmente obtidas em concentrações mais altas de óleo. Entretanto, após uma semana de armazenamento, obteve-se um aumento significativo no diâmetro das partículas, sendo esse incremento superior às demais formulações. Esse aspecto pode ser atribuído ao extravasamento do lipídio da matriz do carreador, em que o óleo essencial de orégano demonstrou impacto positivo no aumento do tamanho das partículas.

O Tween® 80, embora seja um tensoativo estabilizante, não apresentou um efeito significativo isolado na produção do nanossistema. No entanto, sua interação com os lipídios líquidos e sólidos influenciou de maneira substancial a formação de gotículas de maior diâmetro médio em sistemas coloidais, comprometendo a estabilidade do sistema produzido.

A literatura aponta que os tensoativos exercem um duplo efeito na síntese de nanopartículas lipídicas: por um lado, promovem a estabilização interfacial e evitam a agregação de gotículas menores durante o processo de resfriamento; por outro lado, podem aumentar a frequência de colisões entre as partículas, o que, em determinadas condições, pode resultar na redução do seu tamanho (Sakellari *et al.*, 2021). Esse efeito pode estar diretamente relacionado ao aumento da concentração de lipídios no sistema, modulando a dinâmica de formação e estabilização das nanopartículas.

A **Figura 11** representa as médias marginais e os limites de confiabilidade a partir da interação entre as variáveis independentes e a influência na distribuição do tamanho das partículas. Com isso, é possível avaliar as proporções adequadas entre os compostos lipídicos e o tensoativo hidrofílico presente no processo produtivo. Desta forma, é notório que menores tamanhos de partículas podem ser obtidos na menor concentração de óleo essencial de orégano (10 mg), mantendo uma proporção considerável de cera de abelha (10 e 35 mg) e uma concentração variável de Tween® 80 (20 e 30 mg). Em ambos os casos, a redução do tamanho das partículas dependerá de maneira inversamente proporcional do lipídio sólido e do tensoativo hidrofílico.

Figura 11. Médias marginais e limites de confiabilidade das variáveis independentes usadas no planejamento experimental conforme os resultados de tamanho das partículas

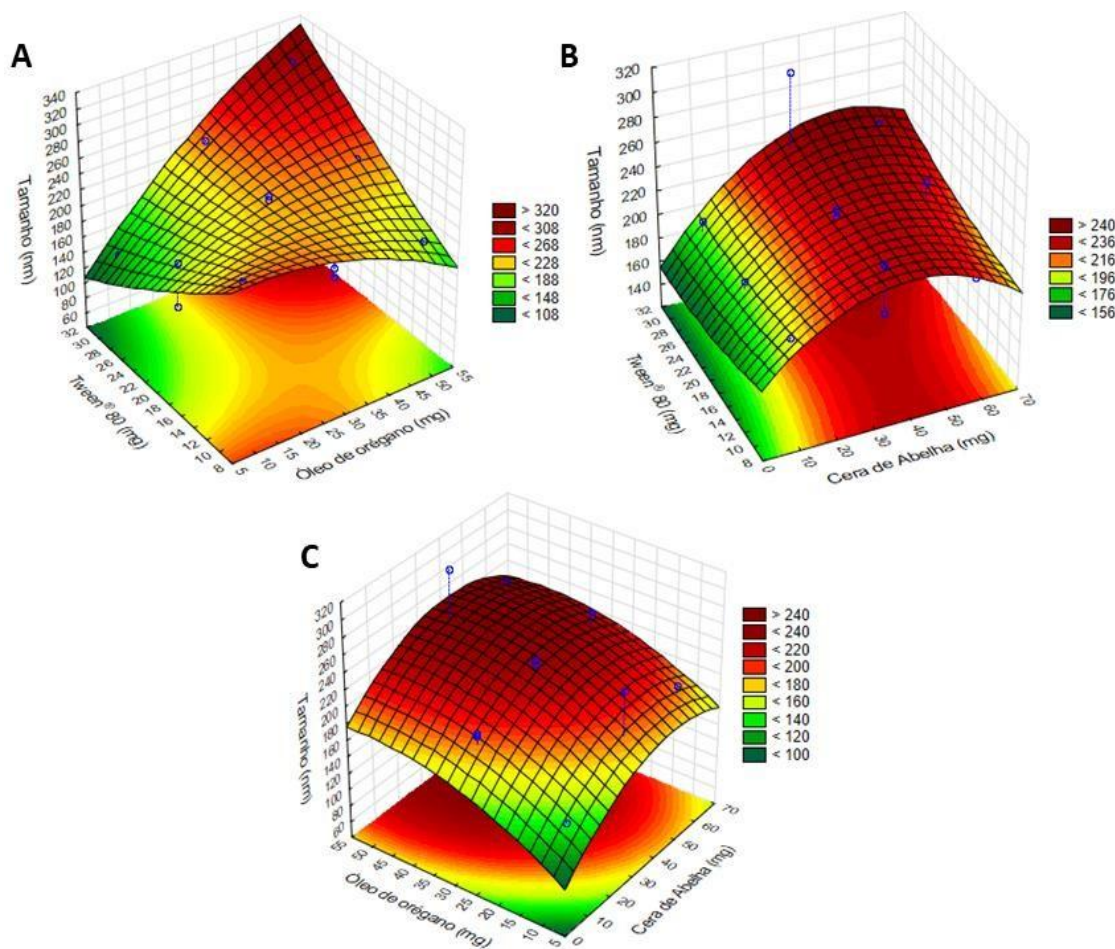


Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por Statistica® (StatSoft®, versão 12.0). Legenda: OEO: óleo essencial de orégano, Cera: cera de abelha.

Exemplificando este cenário, é possível obter partículas < 150 nm ao utilizar 10 mg de óleo essencial de orégano, 10 mg Cera de Abelha e 20 mg de Tween® 80. De modo contrário, se mantido a concentração de OEO em 10 mg, porém utilizando 35 mg de cera de abelha, consequentemente, deve ocorrer o aumento do Tween® 80 para 30 mg, indicando que uma maior concentração de tensoativo hidrofílico torna-se necessário para suprir o aumento da concentração de lipídio sólido.

Os gráficos de superfície de resposta (**Figura 12**) têm como objetivo evidenciar, a partir das interações entre os diferentes componentes, quais seriam as concentrações utilizadas para cada constituinte - variáveis independentes - para se obter os menores tamanhos de partículas – variável dependente -.

Figura 12. Gráficos de superfície de resposta gerados através do planejamento experimental por meio do software Statistica® mediante os resultados de tamanho das partículas



Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por Statistica® (StatSoft®, versão 12.0). Legenda: A) Tween® 80 e óleo essencial de orégano; B) Tween® 80 e cera de abelha; C) óleo essencial de orégano e cera de abelha.

A **Figura 12 (A)** indica que menores tamanhos de partículas podem ser obtidos conforme a interação de maiores concentrações de Tween® 80 e óleo essencial de orégano, respectivamente, tensoativo hidrofílico e lipídio líquido. Por outro lado, ao comparar a interação entre Tween® 80 e cera de abelha (**B**), o tensoativo tende a ser uma variável mais versátil, uma vez que partículas < 200 nm podem ser produzidas independentemente da concentração utilizada, desde que, os nanossistemas contenham uma baixa concentração do lipídio sólido em sua composição final. Por fim, ao comparar o óleo essencial de orégano e a cera de abelha (**C**), os gráficos de superfície de resposta indicam uma melhor interação entre esses componentes quando em menores concentrações desses constituintes na formulação produzida.

A literatura aponta que os lipídios desempenham um papel essencial na constituição

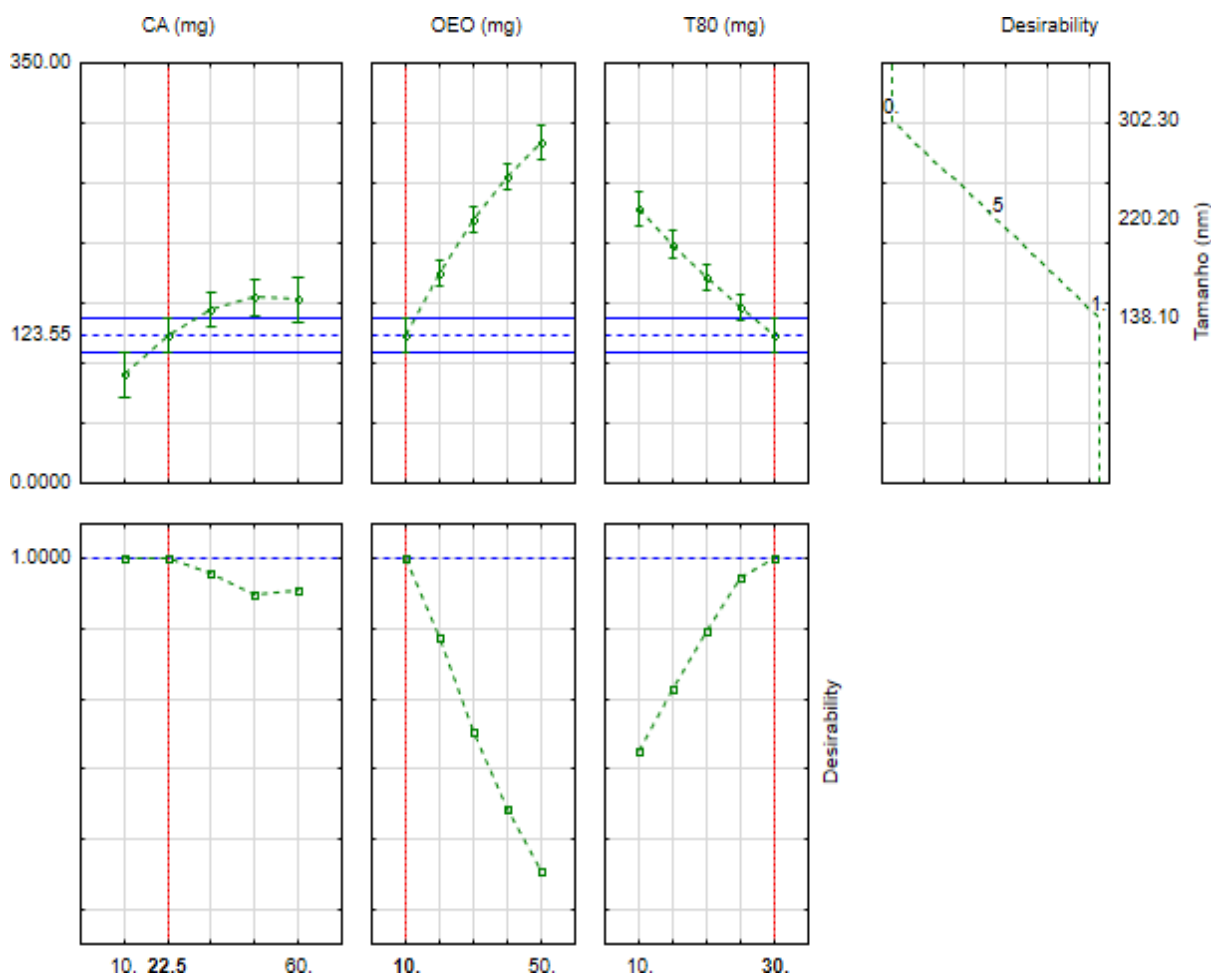
de carreadores lipídicos nanoestruturados, promovendo um aumento da carga do medicamento, na duração da ação e na estabilidade prolongada do sistema (Mittal *et al.*, 2024). Aliado a isso, estudos revelam que a utilização de lipídios reduz a necessidade de surfactantes tóxicos para o paciente, favorecendo uma entrega terapêutica segura e eficaz. Contudo, é extremamente reconhecido que, para a formulação de um nanossistema lipídico, a interação entre seus componentes é um fator crucial, uma vez que suas propriedades físico-químicas podem influenciar no tamanho e na homogeneidade do sistema coloidal, dependendo das substâncias e das concentrações empregadas.

Conforme a literatura, o lipídio sólido é a fase dispersa caracterizada por longas cadeias e, apesar de crucial para a compactação do lipídio líquido na matriz do nanossistema, sua concentração deve resultar em uma matriz amorfa capaz de aprimorar o encapsulamento e transporte do fármaco (Graván *et al.*, 2023; Viegas *et al.*, 2023). Quando em concentrações elevadas, ele tende a influenciar na cristalinidade do sistema, resultando no aumento do tamanho das partículas (Apostolou *et al.*, 2021). Por outro lado, os surfactantes surgem como agentes estabilizantes, uma vez que controlam a tensão interfacial entre os componentes, promovem a estabilização do processo de cristalização dos lipídios e geram repulsão elétrica e eletrostática entre os carreadores (Thuy *et al.*, 2022; Mall *et al.*, 2024).

Dessa forma, o incremento da concentração de óleo de orégano exige um aumento proporcional à concentração do Tween[®] 80, um tensoativo hidrofílico essencial para redução da tensão interfacial e do diâmetro das partículas. Em contraste, quando a concentração do lipídio sólido, como a cera de abelha, é reduzida, a quantidade necessária do tensoativo hidrofílico torna-se variável, uma vez que a solidificação ou cristalização do nanossistema ocorre de forma menos intensa. Por fim, a obtenção de carreadores com menor diâmetro requer concentrações reduzidas de lipídios líquidos e sólidos, evitando a formação de gotículas de maior tamanho, que poderiam aumentar o diâmetro médio das partículas e intensificar a polidispersão do sistema.

O gráfico de perfil para valores previstos e desejabilidade (**Figura 13**) apresenta a concentração ideal dos compostos, determinada a partir dos ensaios experimentais com planejamento fatorial, para a produção de um carreador lipídico nanoestruturado com tamanho médio de partícula de 123,5 nm. De acordo com o software, a obtenção de partículas menores é favorecida pelo uso de **22,5 mg de cera de abelha** como lipídio sólido, **10 mg de óleo essencial de orégano** como lipídio líquido e **30 mg de Tween[®] 80** como surfactante hidrofílico.

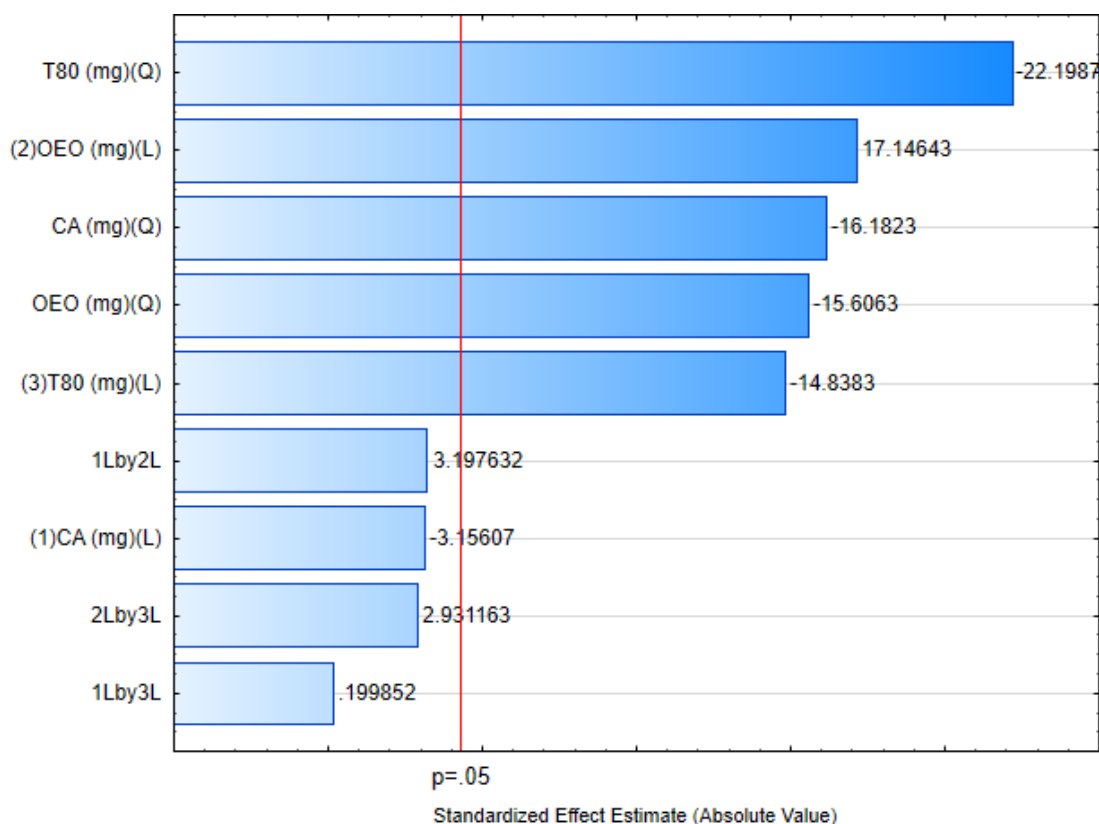
Figura 13. Gráficos dos perfis para valores previstos e desejabilidade obtidos através do planejamento experimental de acordo com os resultados de tamanho das partículas



Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por Statistica® (StatSoft®, versão 12.0). Legenda: OEO: óleo essencial de orégano, CA: cera de abelha. T80: Tween® 80.

A **Figura 14** apresenta o diagrama de Pareto durante a produção dos CLNs, a fim de identificar as variáveis estatisticamente significativas na carga de superfície das partículas, fornecendo valores lineares (L) e quadráticos (Q) para as interações. Diante disso, a qualidade do ajuste do modelo proposto foi avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2), que mostra um nível de confiança na probabilidade de valores previstos vs observados. A matriz foi considerada estatisticamente significativa ($R^2=0,9258$), tendo 92,6% de variabilidade na variável de resposta. Além disso, a alta significância do modelo foi confirmada pelo valor do coeficiente de determinação ajustado ($Adj R^2=0,7922$), garantindo um alto nível de fidelidade aos dados explorados.

Figura 14. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis independentes conforme os resultados da carga de superfície das partículas



Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por Statistica® (StatSoft®, versão 12.0). Legenda: OEO: óleo essencial de orégano, CA: cera de abelha. T80: Tween® 80.

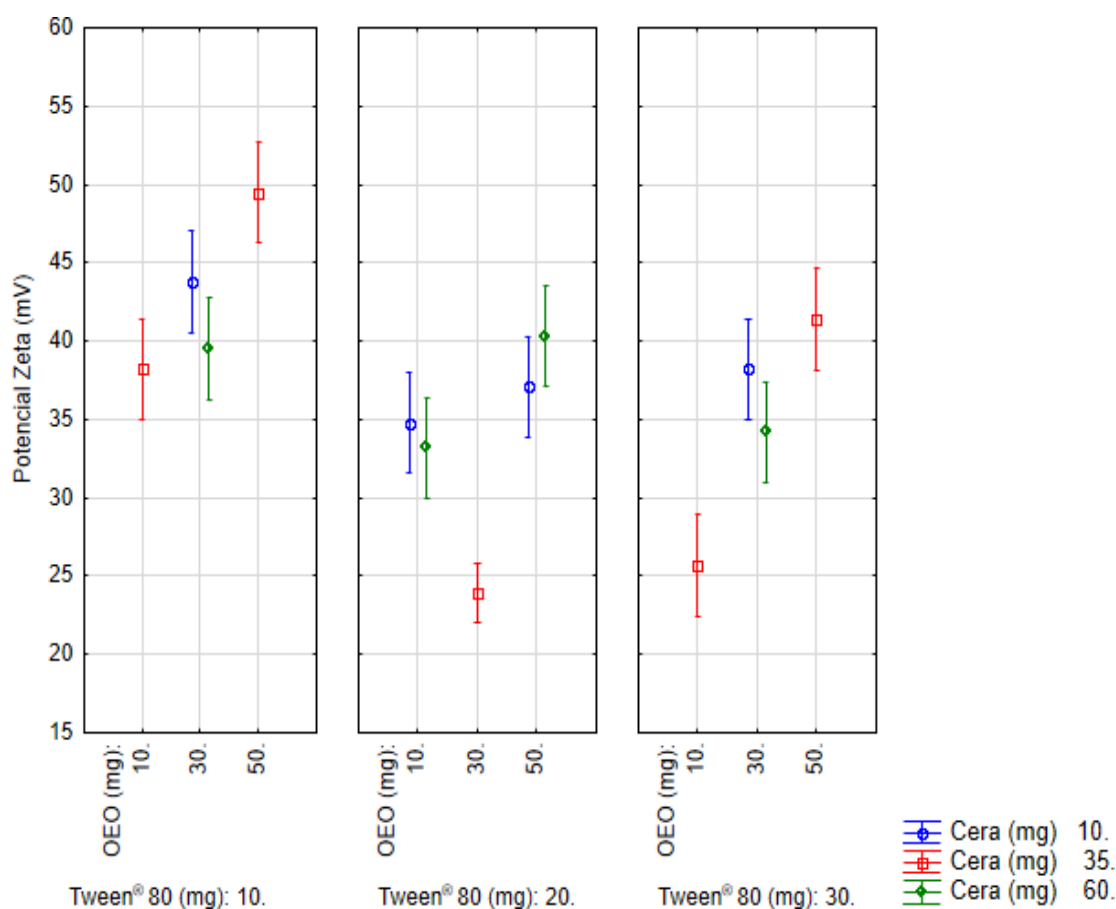
Considerando cada uma das variáveis apresentadas no diagrama de Pareto, óleo essencial de orégano, cera de abelha e Tween® 80 demonstraram ser variáveis independentes do estudo que obtiveram um efeito significativo na produção de CLN. óleo essencial de orégano (L) demonstrou um efeito positivo no aumento da carga de superfície, enquanto Cera de Abelha (Q), óleo essencial de orégano (Q) e Tween® 80 (L e Q) demonstraram um efeito negativo para a diminuição da carga de superfície das partículas. Por outro lado, cera de abelha (L), assim como a interação de Cera de Abelha (L) e OEO (L) e a interação de Tween® 80 (L) com cera de abelha (L) e OEO (L) não ofereceram efeito significativo para a produção dos carreadores.

A **Figura 15** representa as médias marginais e os limites de confiabilidade a partir da interação entre as variáveis independentes e a influência na distribuição da carga de superfície das partículas. Diante disso, observou-se as relações de proporcionalidade entre os compostos lipídicos e o tensoativo hidrofílico para a produção do nanossistema. No que tange a isso, a figura demonstra com base no planejamento experimental que cargas de superfície superior a -25 mV podem ser obtidos na concentração intermediária de Cera de Abelha (35 mg), menor de óleo de orégano (10 mg) e na maior de Tween® 80 (30 mg). Por outro lado, é possível obter

carga de superfície de -50 mV, se utilizado diferentes concentrações de óleo de orégano (50 mg), cera de abelha (35 mg) e Tween® 80 (10 mg).

Contudo, com base em nossos dados experimentais, constatou-se que o aumento da concentração de lipídio líquido, em contrapartida à redução das concentrações de lipídio sólido e tensoativo, realizado em um sistema macroscopicamente polidisperso, com a formação visível de gotículas de óleo em sua superfície. Esse achado pode ser correlacionado com relatos da literatura que indicam um aumento no potencial Zeta para valores próximos a -50 mV, atribuído à maior exposição de grupos hidroxilas (-OH) presentes no óleo essencial de orégano. Esse efeito sugere a ineficácia do processo de encapsulamento, uma vez que a presença desses grupos funcionais na interface indica uma menor incorporação do óleo na matriz lipídica, comprometendo sua estabilidade (Uchôa *et al.*, 2025).

Figura 15. Médias marginais e limites de confiabilidade das variáveis independentes usadas no planejamento experimental conforme os resultados da carga de superfície das partículas

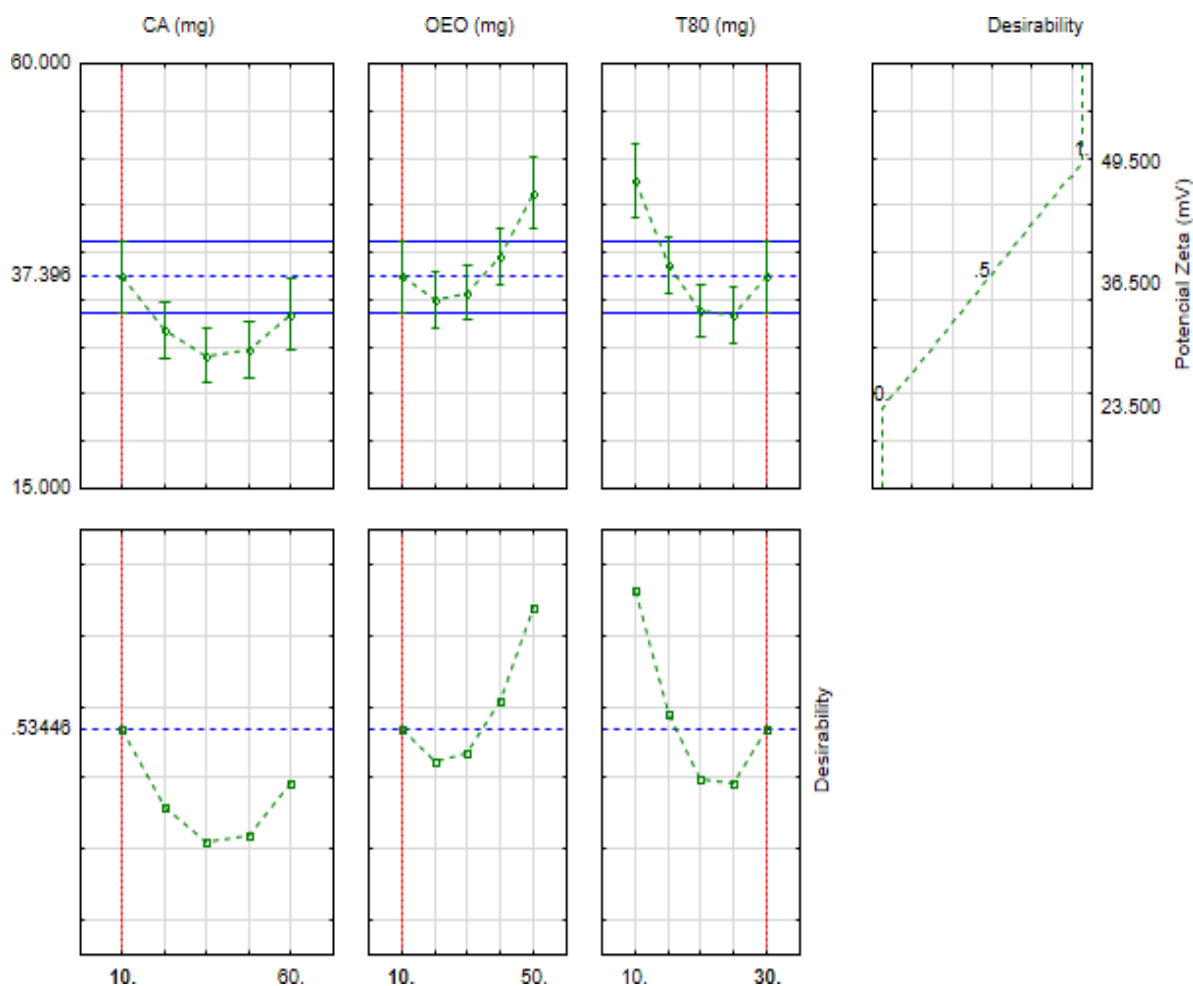


Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por Statistica® (StatSoft®, versão 12.0). Legenda: OEO: óleo essencial de orégano, Cera: cera de abelha.

O gráfico de perfil para valores previstos e desejabilidade (**Figura 16**) apresenta a concentração ideal dos compostos, determinada a partir dos ensaios experimentais com

planejamento fatorial, para a produção de um carreador lipídico nanoestruturado com carga de superfície acima de -37 mV. Com base no Statistica®, partículas com maior carga de superfície podem ser obtidas ao utilizar **10 mg de cera de abelha** como lipídio sólido, **10 mg de óleo essencial de orégano** como lipídio líquido e **30 mg de Tween® 80** como surfactante hidrofílico.

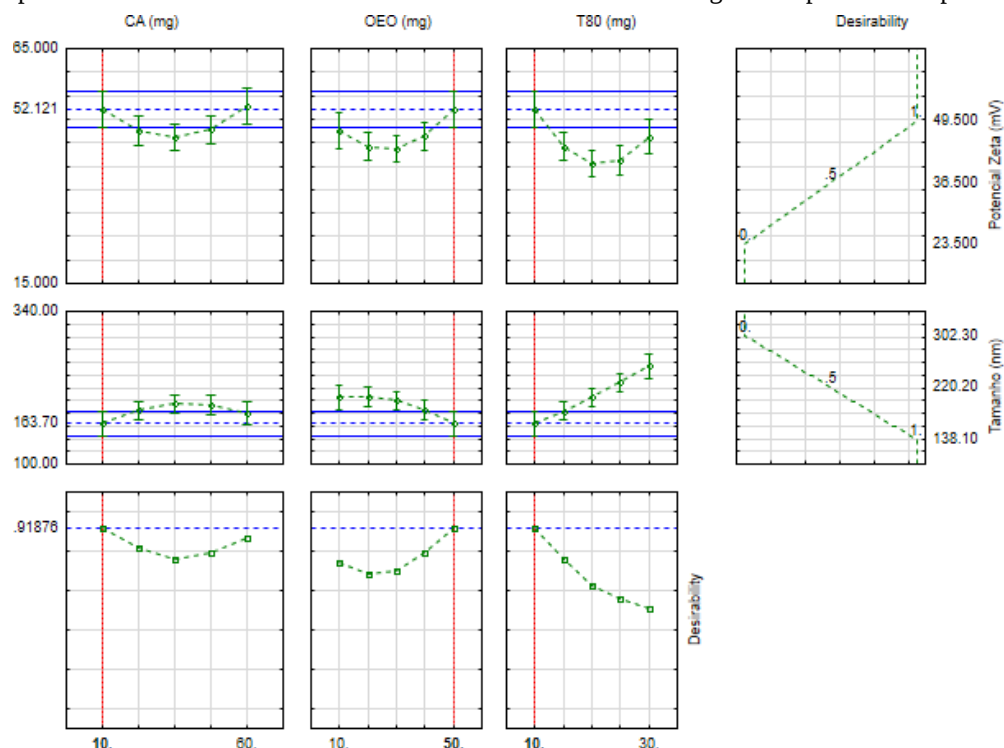
Figura 16. Gráficos dos perfis para valores previstos e desejabilidade obtidos através do planejamento experimental de acordo com os resultados da carga de superfície das partículas



Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por Statistica® (StatSoft®, versão 12.0. Legenda: OEO: óleo essencial de orégano, CA: cera de abelha. T80: Tween® 80.

Por outro lado, ao analisar a interação dos parâmetros físico-químicos de tamanho (nm) e carga de superfície (potencial Zeta), a **Figura 17** demonstra, com base no gráfico de perfil para valores previstos e desejabilidade a concentração necessária para a produção do nanossistema. Para tanto, as partículas serão produzidas ao utilizar **10 mg de cera de abelha** como lipídio sólido, **50 mg de óleo essencial de orégano** como lipídio líquido e **30 mg de Tween® 80** como surfactante hidrofílico.

Figura 17. Gráficos dos perfis para valores previstos e desejabilidade obtidos através do planejamento experimental de acordo com os resultados de tamanho e da carga de superfície das partículas



Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por Statistica® (StatSoft®, versão 12.0). Legenda: OEO: óleo essencial de orégano, CA: cera de abelha. T80: Tween® 80.

5.5 OTIMIZAÇÃO DOS NANOSSISTEMAS PRODUZIDOS

A produção dos nanossistemas obtidos de acordo com o planejamento experimental foi descrita anteriormente no item 4.6. Os resultados de caracterização de partícula são demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5. Otimização das formulações obtidas de acordo com o planejamento experimental do tipo *Box-Behnken*

Formulação	Composição dos componentes (%)			Tamanho (nm)	PdI	PZ (mV)
	Cera	OEO	Tween			
oCLN1	1	1	3	97,7 ± 1,0	0,24 ± 0,00	-18,6 ± 2,2
oCLN2	2,25	1	3	132,4 ± 1,0	0,22 ± 0,01	-26,0 ± 0,9
oCLN3	1	5	1	241,1 ± 1,8	0,23 ± 0,01	-38,5 ± 1,0

Fonte: Próprio autor, 2025. Legenda: oCLN: Carreador lipídico nanoestruturado otimizado. OEO: óleo essencial de orégano, Cera: cera de abelha. Tween: Tween® 80. PdI: índice de polidispersão. PZ: potencial Zeta (mV).

Diante dos resultados apresentados, observou-se uma discrepância dos dados apresentados ao serem comparados com os resultados delimitados pelo software Statistica com

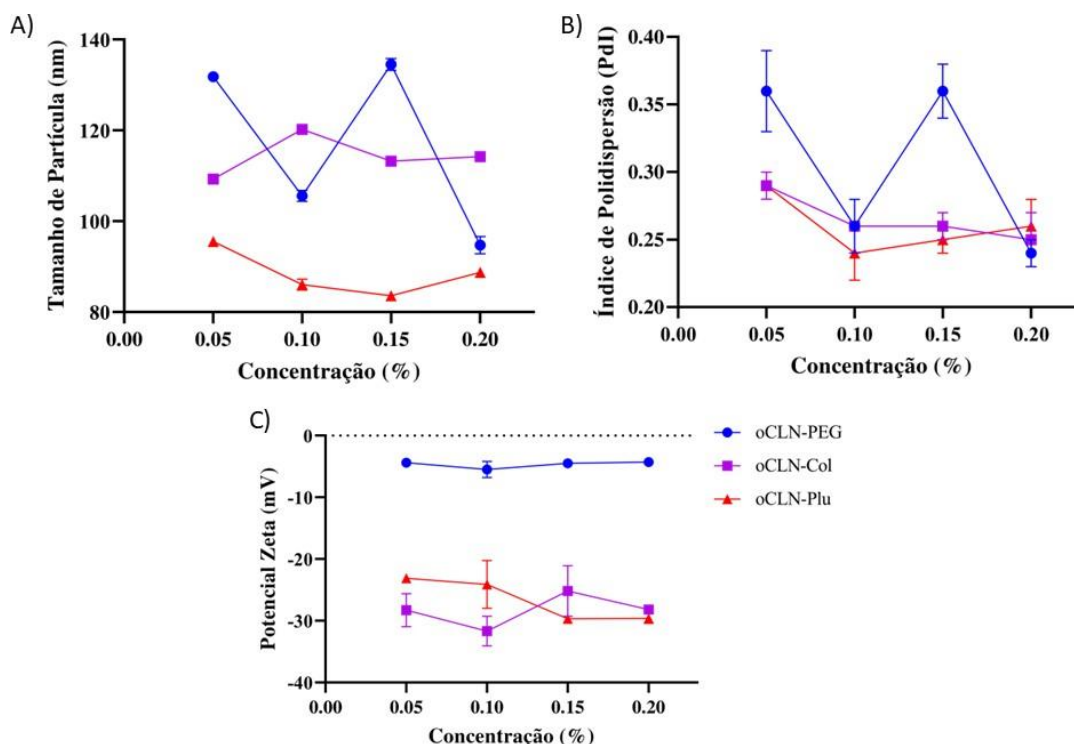
base nos gráficos dos perfis para valores previstos e desejabilidade obtidos através do planejamento experimental.

As formulações oCLN1 e oCLN3, produzidas, respectivamente, a partir dos estudos experimentais desenvolvidos com base nos gráficos da carga de superfície e da interação entre tamanho e carga, apresentaram valores diferentes ao estimado pelo estudo. oCLN3 contendo a maior concentração de OEO (5%), apresentou um valor mais elevado de carga de superfície ($-38,5 \pm 1,0$ mV), indicando que essa característica pode estar associada à ineficiência na encapsulação do óleo de orégano, resultando na exposição dos grupos hidroxilas e, consequentemente, em uma partícula mais negativa. Ademais, embora a formulação oCLN2 tenha demonstrado participação predominante de similariedade dos dados, não foi selecionada para a continuidade nos experimentos, pois empregou uma concentração maior de lipídio sólido e menor quantidade de lipídio líquido, ativo primordial para a composição do nanossistema terapêutico em questão. Dessa forma, mediante os resultados de tamanho e índice de polidispersão, selecionou-se a formulação oCLN1 como a mais adequada para a funcionalização dos carreadores.

5.6 FUNCIONALIZAÇÃO DO NANOSSISTEMA OTIMIZADO

A funcionalização se dá através da substituição ou adição de materiais biocompatíveis à superfície das partículas, a fim de melhorar o nanossistema otimizado. Neste sentido, a **Figura 18** resulta da variação do tamanho médio das partículas, índice de polidispersão e potencial Zeta das formulações com o aumento das concentrações de colesterol, polietilenoglicol (PEG) e Pluronic[®] F68 (0,05%, 0,1%, 0,15% e 0,2%).

Figura 18. Impacto das concentrações dos componentes funcionalizantes no tamanho médio das partículas (A), índice de polidispersão (B) e potencial Zeta (C) na produção dos carreadores



Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por GraphPad Prism®. Legenda: oCLN-PEG: Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com polietilenoglicol (PEG). oCLN-Col: Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com colesterol. oCLN-Plu: Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com Pluronic® F68.

De modo geral, com exceção das funcionalizações com polietilenoglicol, as formulações obtiveram mudanças significativas nos resultados de tamanho de partícula e índice de polidispersão, neste último caso, apresentando-se dentro dos parâmetros característicos de homogeneidade ao sistema, com valores de PdI abaixo de 0,30. Além disso, todos os nanossistemas funcionalizados também demonstraram bons resultados de potencial Zeta.

A adição de polietilenoglicol ao nanossistema aumentou o tamanho das partículas de forma inversamente proporcional ao aumento da concentração. Desta forma, maiores concentrações de PEG impactaram na formação de partículas com menores valores médios de tamanho em comparação ao nanossistema original, podendo ser atribuído este fato a uma melhor compactação deste constituinte. Essa formulação também exibiu menor PdI entre todas as formulações e mantiveram potenciais Zeta ideais. Diante disso, a formulação oCLN-PEG 0,2% foi selecionada com base no valor médio de tamanho ($94,7 \pm 1,9$ nm), PdI ($0,24 \pm 0,01$) e PZ ($-4,3 \pm 0,2$ mV) obtido. As formulações de PEG são caracterizados por apresentarem valores de potencial Zeta próximos a neutralidade, parâmetros considerados primordiais para estabilidade deste nanossistema.

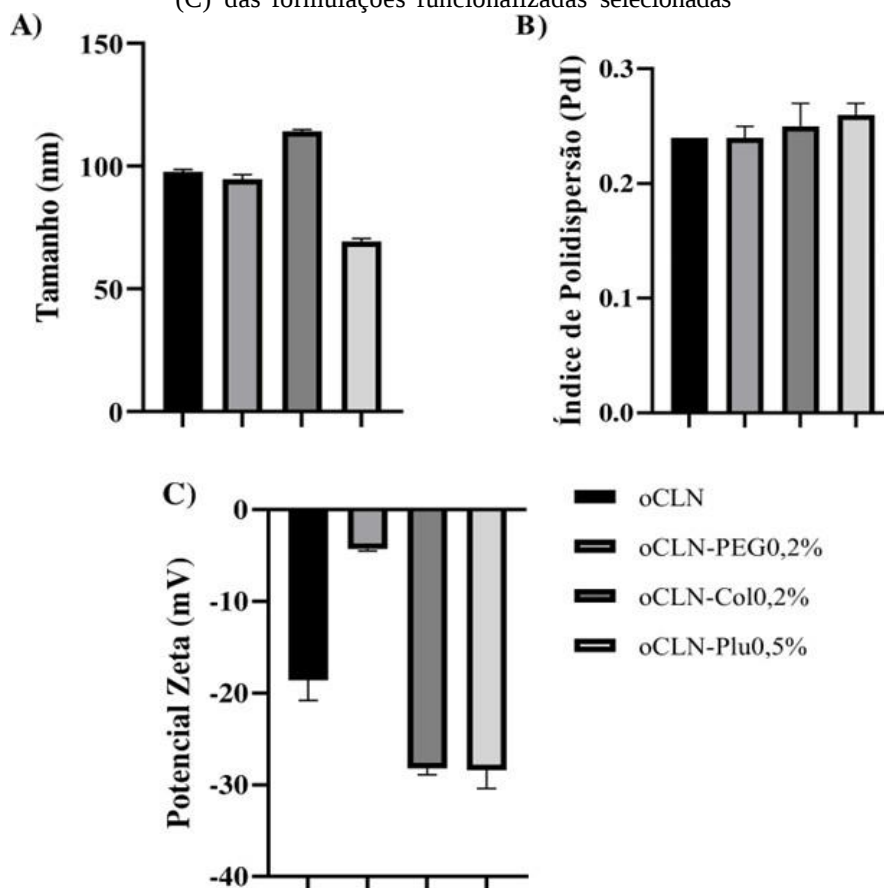
As formulações de colesterol não obtiveram mudanças significativas no tamanho das

partículas ($109,3 \pm 0,6$ a $120,2 \pm 0,2$ nm) e no valor do índice de polidispersão ($0,25 \pm 0,02$ a $0,29 \pm 0,01$) entre as concentrações, entretanto, apresentaram valores aumentados quando comparados ao nanossistema otimizado. No que tange ao potencial Zeta, também obtiveram valores aumentados ($-25,2 \pm 4,1$ a $-31,7 \pm 2,4$ mV) quando comparados ao nanossistema otimizado. A formulação escolhida foi selecionada com base na maior concentração de colesterol no nanossistema (oCLN-Col 0,2%) devido ao tamanho de partícula obtido ($114,2 \pm 0,7$ nm).

Quando comparados à formulação otimizada, os tamanhos das partículas dos nanossistemas funcionalizados com Pluronic® F-68 diminuíram. Diante disso, foram realizados estudos com Pluronic® F-68 em concentrações ainda maiores (0,5%, 1% e 2%). No entanto, até a concentração de 0,5% adicionada, os PdIs mantiveram-se constantes ($0,24 \pm 0,02$ a $0,29 \pm 0,00$) e os potenciais Zeta ainda eram maiores ($-24,1 \pm 3,9$ a $-29,7 \pm 0,5$ mV) do que os da formulação otimizada. Portanto, devido ao menor tamanho obtido ($69,3 \pm 1,2$ nm), foi decidido continuar os experimentos com a formulação oCLN-Plu 0,5%.

As formulações de polietilenoglicol (PEG) e colesterol produzidas exibiram uma aparência macroscópica branca leitosa e homogênea com reflexo azulado, característica do efeito Tyndall, indicando ótima homogeneidade do nanossistema. Já as formulações de Pluronic® F-68 apresentaram uma aparência microscópica, demonstrando um aspecto translúcido característica de microemulsões. A comparação dos tamanhos, PdIs e do potencial Zeta entre todas as formulações escolhidas está exposta na **Figura 19**.

Figura 19. Comparação do tamanho de partícula (A), índice de polidispersão (B) e potencial Zeta (C) das formulações funcionalizadas selecionadas



Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por GraphPad Prism[®]. Legenda: oCLN: Carreador lipídico nanoestruturado otimizado. oCLN-PEG0,2%: Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com polietilenoglicol (PEG) a 0,2%. oCLN-Col0,2%: Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com colesterol a 0,2%. oCLN-Plu0,5%: Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com Pluronic[®] F68 a 0,5%.

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero hidrofílico inerte, disponível comercialmente em uma ampla faixa de peso molecular (2 a 10 kDa), sendo amplamente conhecido por sua baixa toxicidade e resistência à adsorção proteica (Pham Le Khanh *et al.*, 2022). Nos últimos anos, seu uso em nanopartículas tem ganhado destaque devido à sua longa cadeia molecular, que gera impedimentos estéricos contra ligações de proteínas plasmáticas, aumentando a estabilidade das nanopartículas (Kenekchukwu *et al.*, 2022). Somado a isso, o PEG forma uma camada protetora hidrofílica de revestimento nas nanopartículas, reduzindo a adesão da opsonina, evitando a detecção e eliminação desse nanossistema pelas defesas imunológicas do corpo e, assim, prolongando sua meia-vida na circulação sanguínea (Pham Le Khanh *et al.*, 2022; Petrovic; Bitá; Barbinta-Patrascu, 2024). Esse efeito reduz a captação precoce pelo sistema reticuloendotelial, favorecendo uma distribuição mais eficiente e, consequentemente, melhorando a eficácia terapêutica (Santhanakrishnan; Koilpillai; Narayanasami, 2024).

Ao funcionalizar os carreadores com polietilenoglicol (PEG), foram encontradas

partículas de menor tamanho em comparação com a formulação otimizada, desde que em concentrações mais elevadas do modificador de superfície, o que corrobora com os achados de Bazargani *et al.* (2025). O aumento do grau de PEGilação e, conseqüentemente, do revestimento lipídico, desempenha um papel essencial no controle do crescimento das nanopartículas durante o processo produtivo. Dessa forma, o PEG atua como um agente estabilizador, prevenindo a formação de agregados e limitando o aumento do tamanho médio das partículas, efeito atribuído à sua capacidade de gerar impedimentos estéricos (Bazargani *et al.*, 2025).

O colesterol é um metabólito essencial na modulação de processos relacionados à autoimunidade, aterosclerose e células cancerígenas (King; Singh; Mehla, 2022). Em sistemas nanotecnológicos lipídicos, ele é incorporado para facilitar a interação dos nanossistemas com a bicamada lipídica das células, além de auxiliar na compactação no núcleo oleoso por meio da desorganização da estrutura cristalina. Esse efeito contribui para a formação de partículas monodispersas com menor tamanho médio e aprimora tanto o transporte quanto a internalização do fármaco encapsulado (Albertsen *et al.*, 2022; Mehta *et al.*, 2023). No entanto, conforme observado por Khezri *et al.* (2021) em seu ensaio experimental, o revestimento em quantidades muito altas de colesterol em carreadores lipídicos não apresentou efeito significativo no aprisionamento do fármaco. Esse achado corrobora com os resultados obtidos neste estudo, nos quais não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no tamanho e no índice de polidispersão das partículas.

Por fim, o Pluronic® é um copolímero anfifílico biocompatível, com estrutura aniônica, amplamente reconhecido como um estabilizador estérico de membrana (Takegawa *et al.*, 2025). Esse polímero possui a capacidade de se automontar em meio aquoso e adaptar sua estrutura à formação de micelas núcleo-casca, tornando-se uma importante classe de agentes hidrofílicos com carga terapêutica (Khaliq *et al.*, 2023). Nesse contexto, a funcionalização de carreadores lipídicos com o Pluronic® tem se destacado na literatura devido à sua composição estrutural, que contribui para a formação de partículas de pequeno tamanho, reduzindo a rápida depuração e, conseqüentemente, favorecendo a circulação sistêmica, a penetração em tecidos e a absorção celular. Além disso, esse polímero apresenta baixa imunogenicidade e alta biodegradabilidade, características desejáveis para aplicações biomédicas (Naharros- Molinero *et al.*, 2022).

Quando associados à nanotecnologia, o Pluronic® pode ser utilizado em baixas concentrações, uma vez que há relatos na literatura sobre sua toxicidade em doses elevadas. Nesse sentido, a FDA aprovou o uso das variantes Pluronic® F-68 e F-127 para aplicações terapêuticas (Khaliq *et al.*, 2023). Diante disso, no presente estudo, ao realizar a funcionalização dos carreadores lipídicos com Pluronic® F-68, o revestimento exibiu partículas com o maior potencial Zeta negativo, fator atribuído à sua composição estrutural rica em grupamentos

hidroxilas e carboxílicos expostos na superfície do nanossistemas funcionalizado. Ademais, a estabilização estérica ocasionada pelo Pluronic® resultou em uma melhor distribuição do tamanho e do PDI das partículas, corroborando com os resultados de Uchôa *et al.* (2025).

5.7 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

5.7.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A fim de se obter a confirmação da estrutura e composição química das amostras, bem como a presença dos grupos funcionais, é essencial identificar os picos correspondentes a cada elemento do sistema, além de avaliar possíveis interações e a formação de novos compostos resultantes das reações entre os constituintes dos nanossistemas produzidos. Desta forma, os componentes isolados e os nanossistemas foram analisados por meio da técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (**Figura 20 e 21**).

Observou-se que o óleo essencial de orégano exibiu bandas intensas em 3500 e 3200 cm^{-1} (vibração de alongamento -OH). Sinais característicos em 2960 e 2850 cm^{-1} (estiramento simétrico -CH e -CH₂). Além disso, sinal em 1460 cm^{-1} indica à flexão de -CH₂ alifáticos e em 1424 cm^{-1} há a presença do sinal característico de alongamento C-C do anel aromático do carvacrol. Picos na região de 1254 a 1000 cm^{-1} podem ser atribuídos à ligação C-O-C, enquanto o pico em 939 cm^{-1} corresponde a absorção do anel C-H. O sinal em 814 cm^{-1} pode ser relacionado a vibrações de agitação C-H fora do plano, indicativo de substituições em anel aromático. Ademais, bandas intensas entre 1200 e 900 cm^{-1} foram associados à presença de carvacrol, composto majoritário do óleo de orégano (Plati; Papi; Paraskevopoulou, 2021; Yoncheva *et al.*, 2021; Iqbal *et al.*, 2023).

A cera de abelha, por sua vez, apresentou sinais característicos de estiramento simétrico e assimétrico dos grupos alcano e hidrocarboneto, observados em 2960 e 2850 cm^{-1} , respectivamente. Além disso, uma banda proeminente foi observada em 1742 cm^{-1} , correspondente às vibrações de alongamento C=O de ésteres e ácidos graxos livres. Na região de 1459 e 1157 cm^{-1} foram detectados sinais característicos atribuídos, respectivamente, à flexão O-H do grupo carbonila e ao alongamento das ligações C-O dos ésteres alifáticos e vibrações de flexão -CH₂. Por fim, um pico em 719 cm^{-1} foi associado ao balanço de -CH₂ dos hidrocarbonetos presentes na cera de abelha (Wei *et al.*, 2024; Millao *et al.*, 2025).

O Span® 60 apresentou sinais espectrais característicos que confirmam sua estrutura química. As vibrações de estiramento da ligação -CO foram identificadas nas bandas de 1052 e 1092 cm^{-1} , enquanto a vibração de alongamento da carbonila C=O de ésteres foi observada em 1730 cm^{-1} . Além disso, um sinal em 2929 e 2848 cm^{-1} foi atribuído à vibração de alongamento de grupos metileno (-CH₂) e metil (-CH₃). Por fim, um pico moderado na região de 3500 cm^{-1}

foi associado à vibração de alongamento do grupo hidroxila (-OH) (Bharti *et al.*, 2022; Saharkhiz; Zarepour; Zarrabi, 2023). Esses achados corroboram a presença dos grupos funcionais característicos do Span® 60, um surfactante amplamente utilizado em formulações nanotecnológicas devido à sua capacidade emulsificante e estabilizadora.

O espectro de infravermelho do surfactante Tween® 80 exibiu bandas moderadas de sinais em 2900 e 2860 cm^{-1} (estiramento simétrico C-H das unidades de óxido de etileno). Sinais característicos na área de 1700 cm^{-1} (vibrações de alongamento C=O de grupos carbonila e éster) também foram observados. Ademais, picos em 1360 cm^{-1} (flexão de -CH em grupos metil ou metileno), 1210 cm^{-1} (vibração de alongamento de ligações éter em ésteres C-O-C) e 1111 cm^{-1} (vibração de alongamento C-O-C correspondente ao óxido de etileno) foram identificados. O espectro ainda demonstra uma banda em leve intensidade de sinal em 3500 cm^{-1} , o qual pode ser correlacionado a ligação intermolecular de hidrogênio presente na composição estrutural do Tween® 80 (Qureshi *et al.*, 2023; Kudlacik-Kramarczyk *et al.*, 2024).

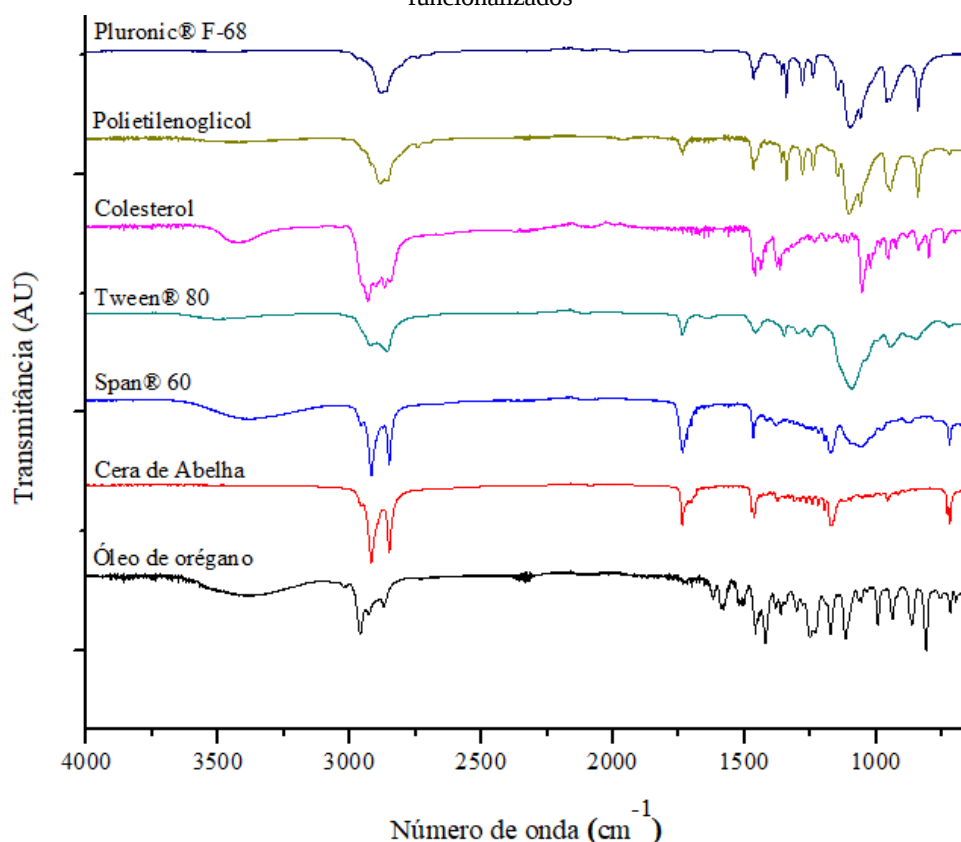
A presença da molécula de colesterol no espectro foi confirmada por meio de bandas características que corroboram sua composição estrutural. Um pico significativo foi identificado em 3400 cm^{-1} , associado à vibração de alongamento da hidroxila (-OH). Além disso, sinais na região de 3000-2800 cm^{-1} foram atribuídos às vibrações de alongamento simétrico e assimétrico dos grupos -CH₂ e -CH₃. A estrutura química do colesterol é reconhecida pela presença da dupla ligação no segundo anel do composto, observado e evidenciado através do sinal em 1647 cm^{-1} . Por fim, um pico acentuado em 1055 cm^{-1} , correspondente à deformação dos anéis de ciclopentano-peridrodenantreno foi observado (Qureshi *et al.*, 2023; Gau *et al.*, 2025).

Em relação aos sinais do espectro de infravermelho do polietilenoglicol (PEG), vibrações de alongamento de grupos hidroxila -OH em 3440 cm^{-1} e de simetria e assimetria -CH do grupo -CH₂ em 2862 e 2865 cm^{-1} foram observadas. Além disso, um sinal fraco em 1245 cm^{-1} foi atribuído à vibração de alongamento -CO, e as vibrações de flexão -CH do grupo -CH₂ foram detectadas em 1452 e 1454 cm^{-1} . O espectro também revelou sinais relacionados à estrutura estérica do PEG, com o alongamento simétrico C-O-C observado em 937 e 1094 cm^{-1} do grupo éster alifático (De Caro *et al.*, 2025; Erdem; Kandemir; Alp, 2025; Souto *et al.*, 2025).

No espectro do Pluronic® F-68, foram observadas bandas características que corroboram sua estrutura química, conforme Rosiak e colaboradores (2025) relata em sua literatura. Sinais distintos em pico único podem ser observados na região de 1468 cm^{-1} (vibrações de tesoura de metileno -CH₂), 1360 cm^{-1} (vibrações de alongamento metileno -CH₂), 1342 cm^{-1} (vibração de flexão de grupos hidroxila - OH), 1281 e 1242 cm^{-1} (vibrações de

alongamento de ésteres C-O-C), 1146 cm^{-1} (estiramento simétrico de metileno $-\text{CH}_2$), 1099 e 1061 cm^{-1} (estiramento simétrico de éster), e, 962 , 947 e 841 cm^{-1} (vibrações de alongamento das ligações carbonila - CO). Esses achados são compatíveis com a estrutura do Pluronic® F-68, evidenciando a comprovação de suas características químicas e interações funcionais.

Figura 20. Espectros de FTIR dos componentes utilizados na produção dos CLNs otimizados e funcionalizados

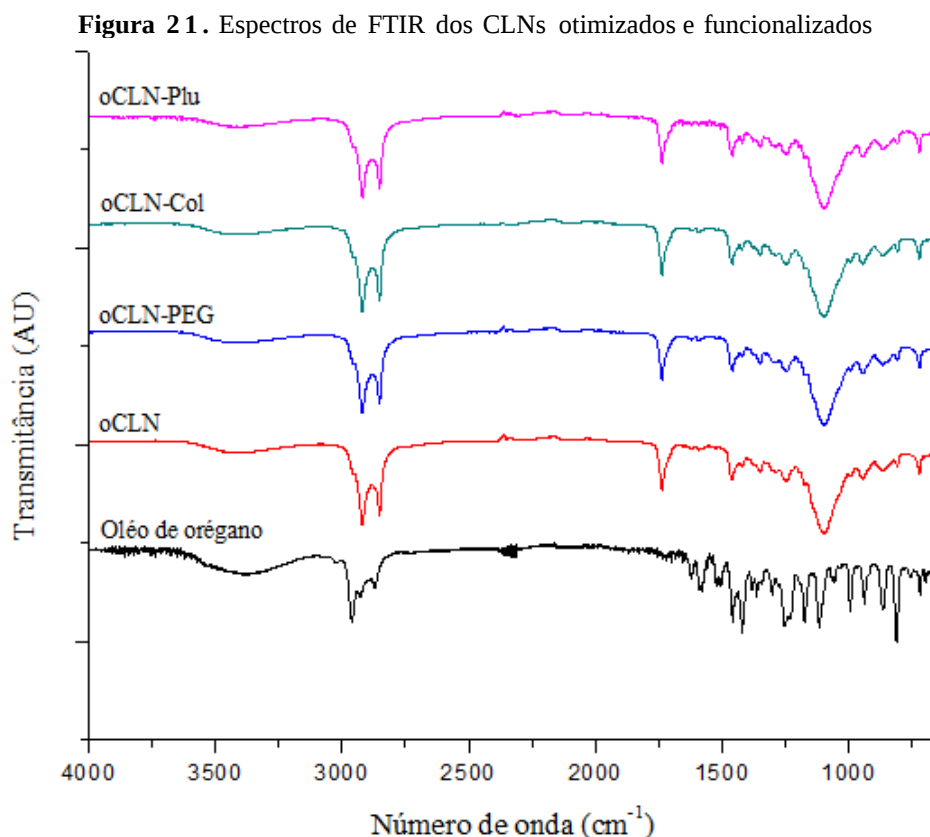


Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por Origin8®.

O espectro de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) das formulações apresentou um padrão comparativo semelhante, conforme representado na **Figura 21**. Ao comparar as bandas espectrais das formulações com o óleo de orégano isolado, observou-se uma acentuação na intensidade do sinal próximo a 3300 cm^{-1} (estiramento O-H de grupos funcionais hidroxilas), indicando uma possível encapsulação do óleo essencial de orégano pelos outros componentes da formulação (Yoncheva *et al.*, 2021).

Além disso, todas as formulações exibiram um sinal acentuado na região de 1000 cm^{-1} (estiramento C-O em anéis), atribuído à presença do Tween® 80 em sua superfície (Affram *et al.*, 2020). Também foram observadas bandas sobrepostas entre 2846 e 2922 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento simétrico e assimétrico dos grupos alcano e hidrocarboneto ($-\text{CH}$ e $-\text{CH}_2$) da cera de abelha (Pires *et al.*, 2024). Não foi possível identificar, por meio da

técnica, os picos característicos dos funcionalizantes polietilenoglicol (PEG), colesterol e Pluronic® F-68. Esse resultado pode estar relacionado à sobreposição do sinal proveniente da alta concentração do tensoativo hidrofílico, aliado à baixa concentração desses modificadores de superfície, que estão presentes em níveis inferiores a 1%.

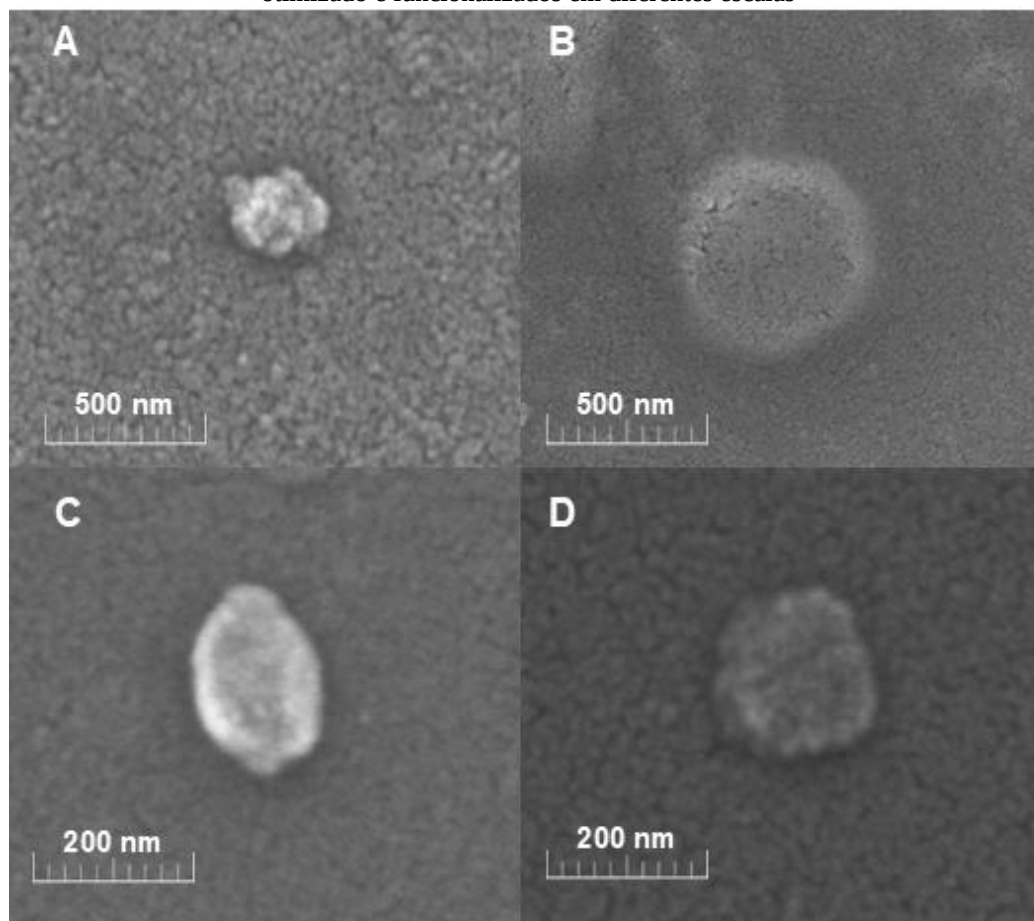


Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por Origin8®.

5.7.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das nanopartículas foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), técnica essencial para a caracterização tridimensional das propriedades do nanossistema, como eficiência de encapsulamento e captação celular dos componentes (Motsoene; Abrahamse; Kumar, 2023; Nosratabadi *et al.*, 2024). Os carreadores produzidos apresentaram formatos esféricos, oblongos e uniformes, com tamanho em concordância aos resultados de caracterização físico-química analisados e baixa agregação lipídica visível, conforme ilustrado na **Figura 22**. Os resultados morfológicos corroboram os dados de tamanho e índice de polidispersão das partículas, alinhando-se às características macroscópicas de dispersões coloidais. Essas observações sugerem estabilidade moderada, destacando o potencial do sistema como veículo promissor para entrega do óleo essencial de orégano.

Figura 22. Imagens da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos carreadores lipídicos nanoestruturados otimizado e funcionalizados em diferentes escalas

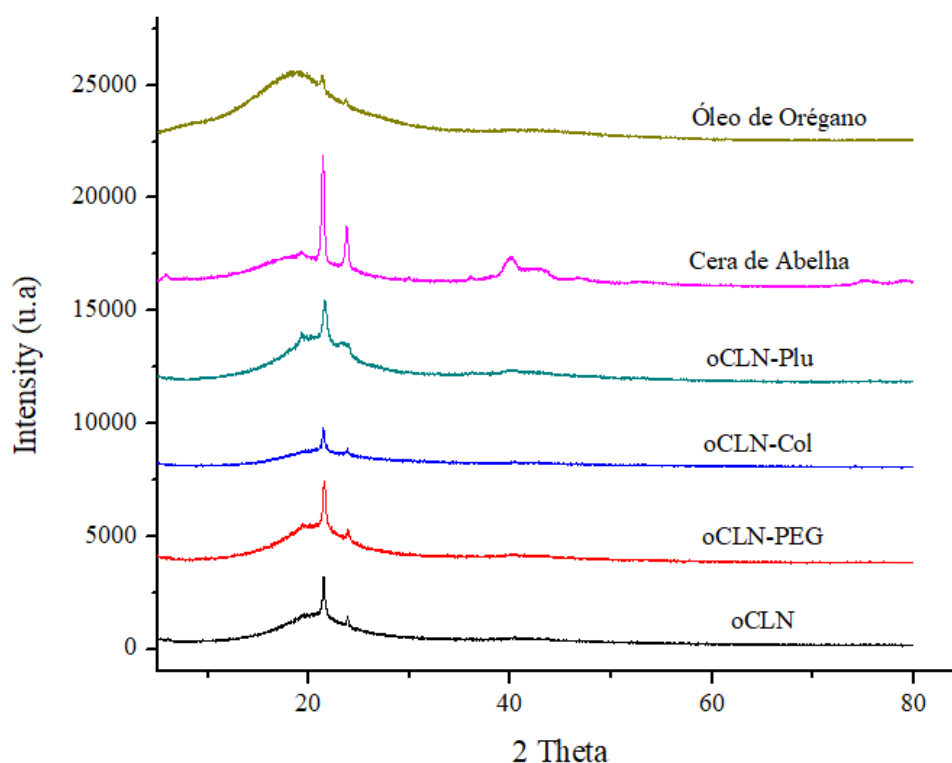


Fonte: Próprio autor, 2025. Legenda: (a) oCLN, (b) oCLN-PEG, (c) oCLN-Col e (d) oCLN-Plu

5.7.3 Difração de Raio-X (DRX)

As propriedades cristalinas dos componentes puros e das nanopartículas foram analisadas através da técnica de Difração de Raio-X (DRX), utilizada para a identificação de estruturas cristalinas, pós cristalinos ou materiais semicristalinos. Essa técnica permite a caracterização da composição estrutural dos compostos por meio da análise dos picos de difração (Korolkovas, 2022). Os difratogramas de óleo de orégano, cera de abelha e dos carreadores produzidos foram demonstrados na **Figura 23**.

Figura 23. Espectros de Difração de Raio-X (DRX) dos compostos isolados e das formulações otimizada e funcionalizadas



Fonte: Próprio autor, 2025. Legenda: u.a: Unidade astronômica. Compostos isolados: Óleo de orégano (óleo essencial de orégano) e Cera de abelha. Formulação otimizada: oCLN (Carreador lipídico nanoestruturado otimizado). Formulações funcionalizadas: oCLN-Plu (Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com Pluronic). oCLN-Col (Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com colesterol). oCLN-PEG (Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com polietilenoglicol).

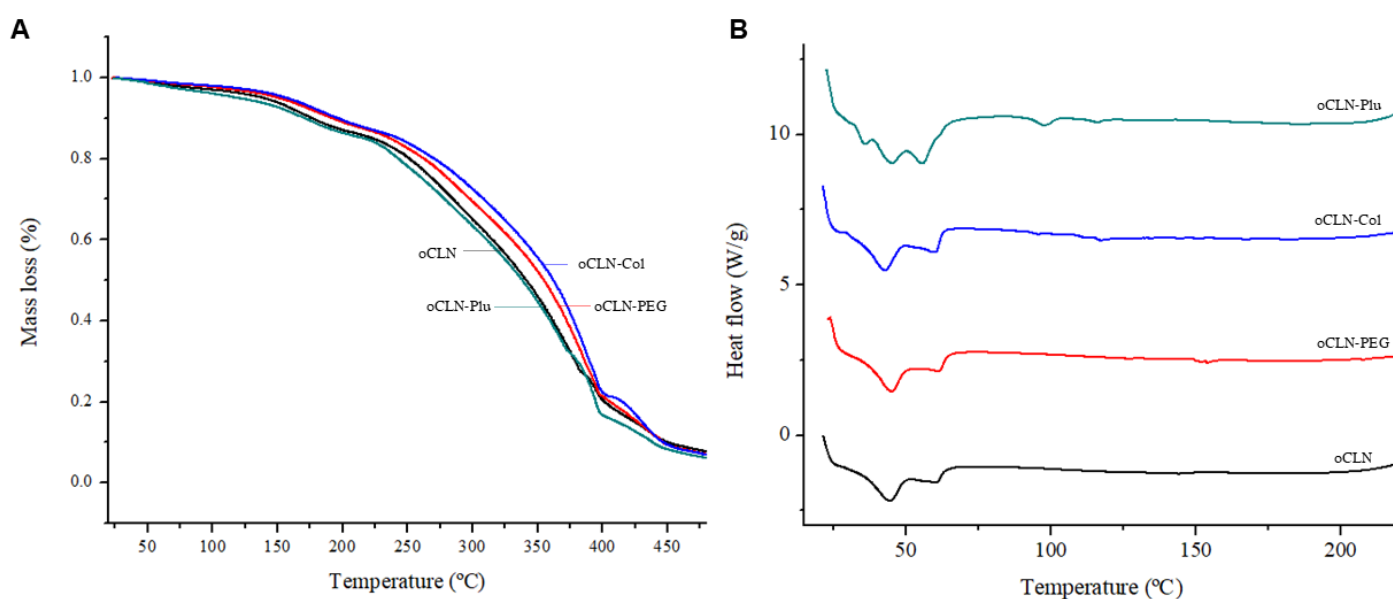
O espectro da cera de abelha apresentou picos agudos, indicando sua natureza cristalina, o que pode ser atribuído à sua composição química e estrutura molecular. Constituída principalmente por ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, além de hidrocarbonetos e outros compostos lipídicos, a sua composição favorece uma maior organização estrutural das moléculas em arranjos semicristalinos, impactando diretamente em suas propriedades térmicas e mecânicas (Candido dos Santos; Malfitano Carvalho; Freire Carvalho, 2024; Ledjanac *et al.*, 2024). Em contraste, o óleo essencial de orégano exibiu poucos picos de difração, indicando uma menor quantidade de cristais em sua estrutura lipídica (Yuan *et al.*, 2023; Gao *et al.*, 2024). Corroborando com essa observação, os picos característicos do óleo não foram detectados nas formulações, sugerindo sua solubilização na matriz lipídica do nanossistema. Esse fato pode ser atribuído à presença da cera de abelha em todas as formulações (oCLN, oCLN-PEG, oCLN-Col e oCLN-Plu), um componente capaz de compactar o óleo e induzir a formação amorfa das

nanopartículas, fator que pode contribuir para a eficiência de encapsulação do óleo de orégano. Além disso, os carreadores apresentaram pequenas variações na expressão de seus picos de difração, possivelmente refletindo a influência dos funcionalizadores de superfície utilizados em sua composição.

5.7.4 Análises Térmicas

Os resultados obtidos por termogravimetria (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) proporcionam uma compreensão aprofundada da estabilidade do nanossistema, permitindo a análise de seu comportamento térmico, grau de cristalinidade e possíveis transições polimórficas dos componentes empregados (Uchôa *et al.*, 2025). A técnica de TGA desempenha um papel crucial na investigação das alterações físicas e químicas associadas à variação da massa do material em função da temperatura, possibilitando a identificação de processos como volatilização, degradação térmica e carbonização. Em contraste, a DSC se destaca como uma ferramenta essencial para monitorar essas transformações térmicas com base nas trocas de calor do sistema com o meio externo, fornecendo informações detalhadas sobre eventos endotérmicos e exotérmicos (Wesolowski; Leyk, 2023). Diante disso, a **Figura 24** ilustra uma comparação entre as análises termogravimétricas e calorimétricas realizadas nos CLNs produzidos.

Figura 24. Análises TGA (A) e DSC (B) dos CLNs



Fonte: Próprio autor, 2025.

A análise termogravimétrica representada na **Figura 24A** revela um padrão de perda de massa progressiva, homogêneo em todas as amostras avaliadas. A primeira etapa da redução de massa ocorreu apenas em torno de 250 °C, com uma perda aproximada de 20%, possivelmente atribuída à volatilização de compostos instáveis termicamente (Zhang *et al.*, 2020). Esse comportamento sugere uma baixa quantidade de componentes não encapsulados, uma vez que sua presença resultaria em uma degradação mais precoce, manifestada por perdas de massas significativas em temperaturas inferiores (Yoncheva *et al.*, 2021). Na sequência, observou-se uma perda de massa mais pronunciada entre 350 °C e 450 °C, fenômeno associado à degradação térmica e subsequente carbonização da matriz lipídica, refletindo o comportamento térmico dos constituintes do nanossistema (Yoncheva *et al.*, 2021).

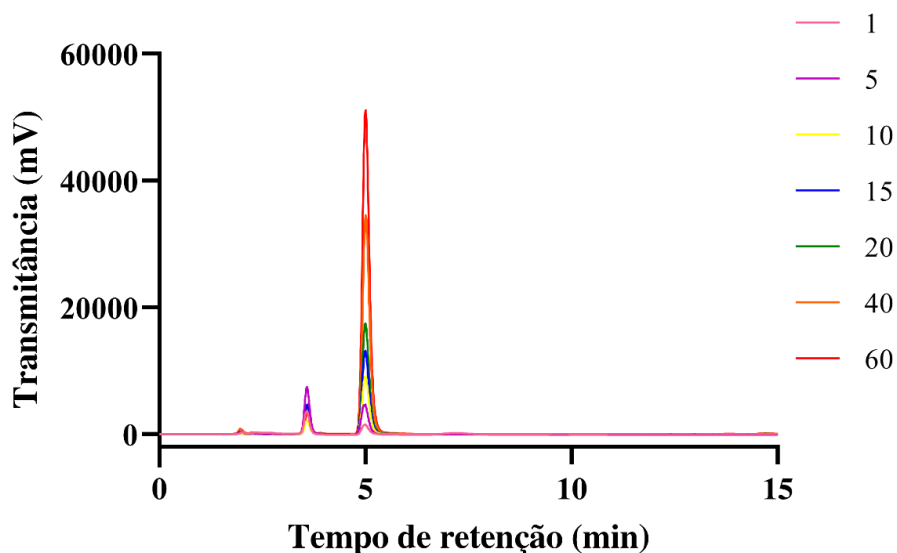
A **Figura 24B** evidencia o ponto de fusão do lipídio sólido presente nas formulações, evidenciando um comportamento térmico semelhante entre elas. Esse comportamento sugere a predominância da cera na matriz lipídica amorfa do nanossistema. Corroborando com esse achado, o estudo de Vykydalová *et al.* (2020) investigou a fusão e desnaturação térmica da cera de abelha por DSC, identificando um pico de transição da fase cristalina para o estado intermediário a 49,2 °C, próximo ao ponto de amolecimento da cera, que ocorre em torno de 50 °C. A semelhança entre esses valores e os obtidos nas formulações de CLNs reforça a coerência dos dados obtidos por calorimetria diferencial exploratória, validando a presença e influência da cera de abelha na estabilidade térmica do nanossistema.

No entanto, embora as formulações apresentassem perfis térmicos semelhantes, a formulação oCLN-Plu apresentou um pico de perda de massa reduzido, o que pode estar relacionado à presença do Pluronic® F-68. Esse polímero atua como um agente estabilizante, promovendo o revestimento da superfície das nanopartículas e conferindo maior estabilidade térmica ao sistema (Khaliq *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2023). Além disso, a partir de 80 °C, não foram observadas variações significativas na perda de massa com o aumento da temperatura, indicando que as amostras mantiveram um padrão consistente de degradação térmica. Esse resultado sugere uma estabilidade térmica uniforme entre as formulações, reforçando a robustez estrutural dos nanossistemas analisados.

5.8 DOSEAMENTO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

Os cromatogramas obtidos do óleo essencial de orégano demonstraram picos com tempo de retenção em torno de 5 minutos (**Figura 25**).

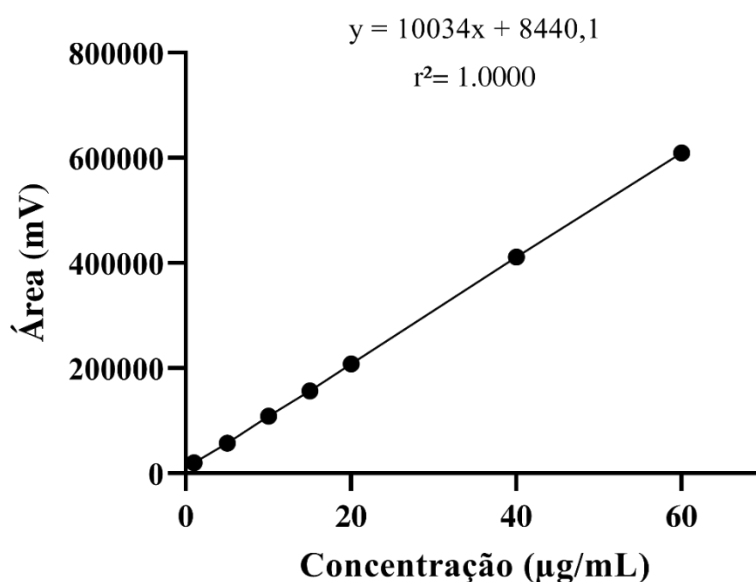
Figura 25. Cromatograma do óleo essencial de orégano por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)



Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por GraphPad Prism®.

As curvas de calibração para o óleo essencial de orégano foram construídas de acordo com as áreas dos picos em relação a várias concentrações. A equação resultante foi $y=10034x+8440,1$, com $R^2=1,0000$ (**Figura 26**).

Figura 26. Curva de calibração do óleo essencial de orégano



Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por GraphPad Prism®.

Sua linearidade, expressa pelos altos valores de R^2 ($=1,00$), confirma a adequação do

método para quantificar os analitos. Isso é crucial para garantir que as variações na quantificação da concentração do padrão do óleo nanoencapsulado.

Além disso, todas as formulações exibiram resultados de quantificação muito próximos ao valor teórico inicial de (8% ou 8 mg/mL), sugerindo que o processo de encapsulamento foi altamente eficiente e que houve perda mínima de óleo durante a preparação do CLN. A eficiência de encapsulamento também foi satisfatória em todas as formulações, com valores variando de 97,15% a 99,98% (**Tabela 6**). Isso indica que a maior parte do óleo essencial foi efetivamente encapsulada dentro das nanopartículas, com ênfase particular na formulação oCLN-Col, que demonstrou a maior eficiência. Esses valores de eficiência de quantificação e encapsulação indicam que todas as formulações são adequadas para a entrega controlada do óleo essencial de orégano.

Tabela 6. Doseamento e Eficiência de Encapsulação dos nanossistemas otimizados e funcionalizados

Formulação	Doseamento (mg/mL)	Eficiência de Encapsulação (%)
oCLN	8,18 ± 1,28	98,80 ± 0,002
oCLN-PEG	9,31 ± 2,46	98,99 ± 0,004
oCLN-Col	8,40 ± 1,80	99,98 ± 0,001
oCLN-Plu	8,84 ± 3,15	97,15 ± 0,005

Fonte: Próprio autor, 2025. oCLN (Carreador lipídico nanoestruturado otimizado). oCLN-PEG (Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com polietilenoglicol). oCLN-Col (Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com colesterol). oCLN-Plu (Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com Pluronic).

Diante disso, o estudo realizado por Cacciatore *et al.* (2020) teve como objetivo encapsular carvacrol em nanoestruturas para avaliar sua atividade antimicrobiana contra patógenos de origem alimentar aderidos ao aço inoxidável. Foram desenvolvidos dois sistemas nanotecnológicos contendo o carvacrol como composto ativo, encapsulado em nanopartículas lipídicas e nanopartículas poliméricas. No primeiro sistema, a eficiência de encapsulação atingiu 98%, enquanto no segundo foi de 97%, indicando que a molécula foi devidamente encapsulada na região hidrofóbica da bicamada das nanopartículas.

Por outro lado, Kubiliene *et al.* (2023) realizaram um estudo comparativo sobre a atividade antioxidante do óleo essencial de *Origanum onites* L. em um modelo *in vivo*. Os autores afirmaram que o óleo foi encapsulado com alta eficiência, apresentando variações mínimas dependendo da composição do nanossistema, com valores entre 96,99 ± 1,21% e 99,34 ± 0,51%.

Assim, para garantir a qualidade dos carreados lipídicos nanoestruturados produzidos, é essencial determinar a eficiência de encapsulamento do composto ativo, idealmente próxima a 100%, de modo a assegurar a máxima incorporação dos bioativos no sistema nanotecnológico

(Kubiliene *et al.*, 2023). Para tanto, a eficiência do método depende, necessariamente, da capacidade de solubilidade do ativo em lipídios sólidos e do coeficiente de partição do sistema (Ijaz; Akhtar, 2020). Além disso, é fundamental destacar que fatores como a natureza do composto, suas propriedades químicas e o método de produção dos nanossistemas influenciam diretamente a EE% (Vergara *et al.*, 2023).

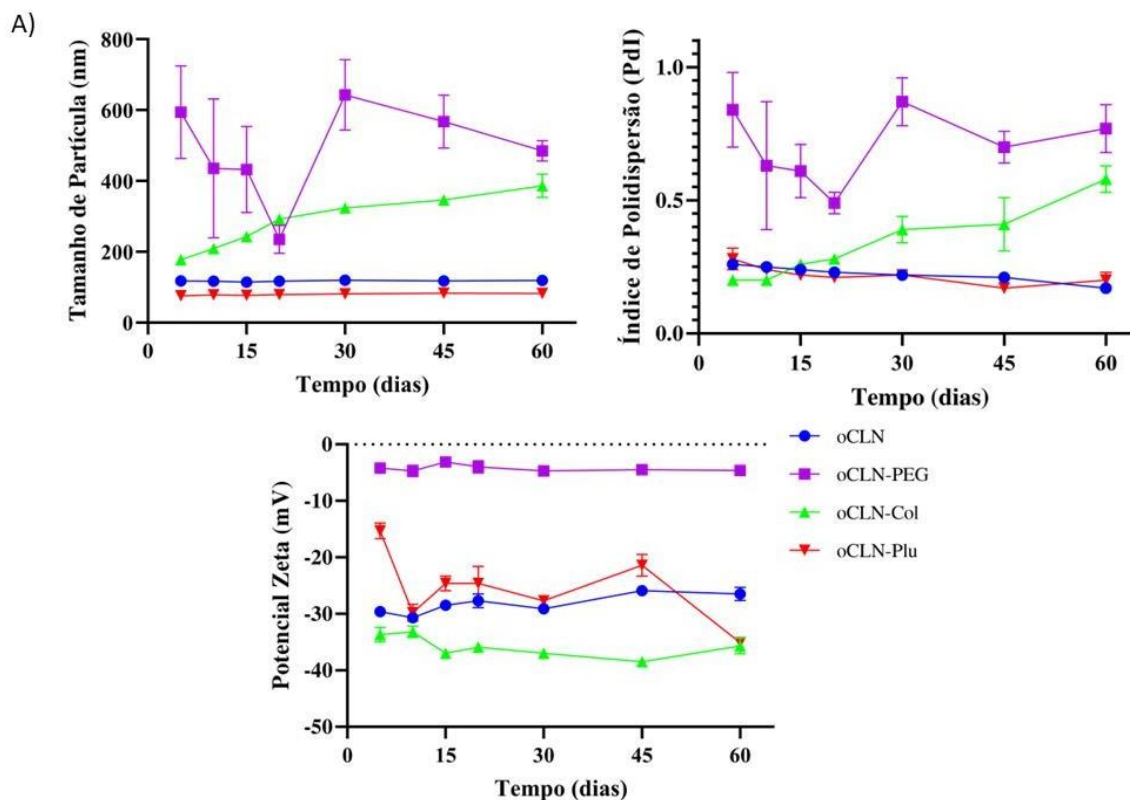
5.9 ESTUDO DE ESTABILIDADE

O desenvolvimento de nanossistemas com parâmetros estáveis ao curto período de tempo é fundamental para se obter uma plataforma de entrega eficaz do fármaco ou ativo de interesse, assegurando a eficácia terapêutica. Sistemas nanotecnológicos instáveis físico-quimicamente podem apresentar atividade reduzida, comprometendo a qualidade da formulação. Diante disso, foram realizados estudos de estabilidade na formulação otimizada (oCLN), bem como nas formulações funcionalizadas com polietilenoglicol (PEG) (0,2% - oCLN-PEG), colesterol (0,2% - oCLN-Col) e Pluronic F-68 (0,5% - oCLN-Plu), avaliando três temperaturas (4, 25 e 37 °C) durante o período de 60 dias, objetivando monitorar o tamanho, PDI e PZ (**Figura 27, 28 e 29**).

À temperatura de 4 °C (**Figura 27**), tanto oCLN quanto oCLN-Plu permaneceram estáveis, sem alterações significativas na coloração, formação de agregados lipídicos ou separação de fases. Os tamanhos de partícula foram de $118,9 \pm 0,17$ e $82,4 \pm 0,64$, respectivamente, com índices de polidispersão (PDI) de $0,17 \pm 0,00$ e $0,20 \pm 0,03$. Quanto ao potencial Zeta, oCLN-Plu apresentou uma variação de $-15,3 \pm 1,4$ mV para $-35,1 \pm 0,8$ mV, resultando, ao final de 60 dias, em um valor superior ao do oCLN. Este último, por sua vez, apresentou uma redução progressiva no PZ ao longo do período de armazenamento, atingindo $-26,5 \pm 1,2$ mV.

Todavia, oCLN-PEG e oCLN-Col apresentaram mudanças abruptas de separação de fases, além de variações expressivas no tamanho das partículas e no PDI, atingindo, no 60º dia, valores de $485,0 \pm 28,7$ nm e $386,4 \pm 32,6$, respectivamente, com PDIs de $0,77 \pm 0,09$ e $0,58 \pm 0,05$, um indicativo do processo de desestabilização das amostras. No entanto, para ambos os sistemas, o PZ manteve-se relativamente estável nessa temperatura.

Figura 27. Estudo de estabilidade dos CLNs quando submetidos a temperatura de geladeira (4 °C) (A) conforme resultados de análise de tamanho (nm), Pdl e potencial Zeta (mV)

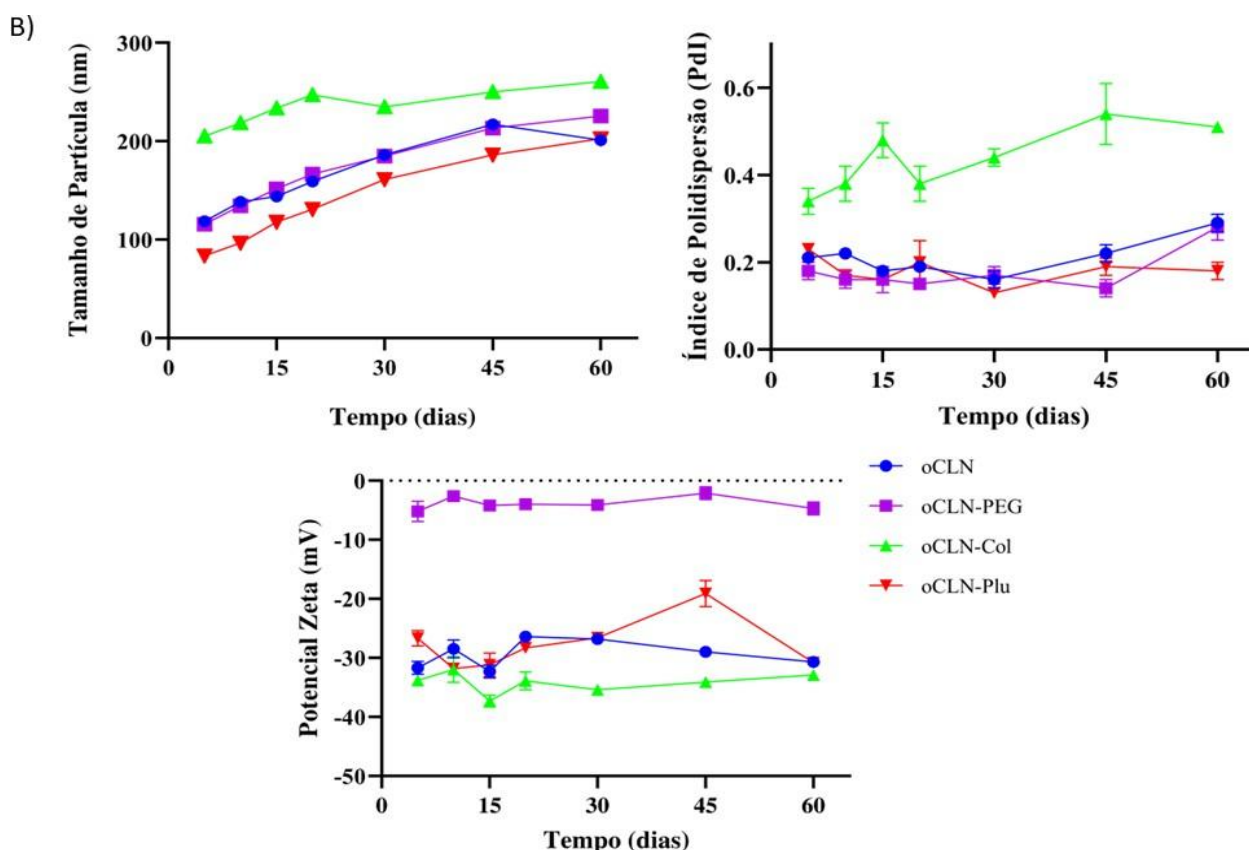


Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por GraphPad Prism®. oCLN (Carreador lipídico nanoestruturado otimizado). oCLN-PEG (Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com polietilenoglicol). oCLN-Col (Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com colesterol). oCLN-Plu (Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com Pluronic).

Por outro lado, à temperatura de 25 °C (**Figura 28**), todas as formulações apresentaram um aumento significativo no tamanho das partículas ao final do tempo de 60 dias, embora tenham mantido valores inferiores a 300 nm e preservando suas características macroscópicas. No que se refere ao índice de polidispersão, oCLN-Col demonstrou instabilidade e maior propensão à formação de agregados lipídicos, com aumento de $0,34 \pm 0,03$ para $0,51 \pm 0,01$.

As demais formulações também apresentaram elevação no Pdl, contudo, os valores permaneceram abaixo de 0,30. Por fim, em relação ao potencial Zeta, oCLN-PEG apresentou estabilidade significativa na repulsão eletrostática do sistema. Em contrapartida, variações acentuadas foram observadas em oCLN-Plu, que atingiu $-19,1 \pm 0,02$ mV no 45º dia, seguido de um aumento para $-30,8 \pm 0,3$ no 60º dia.

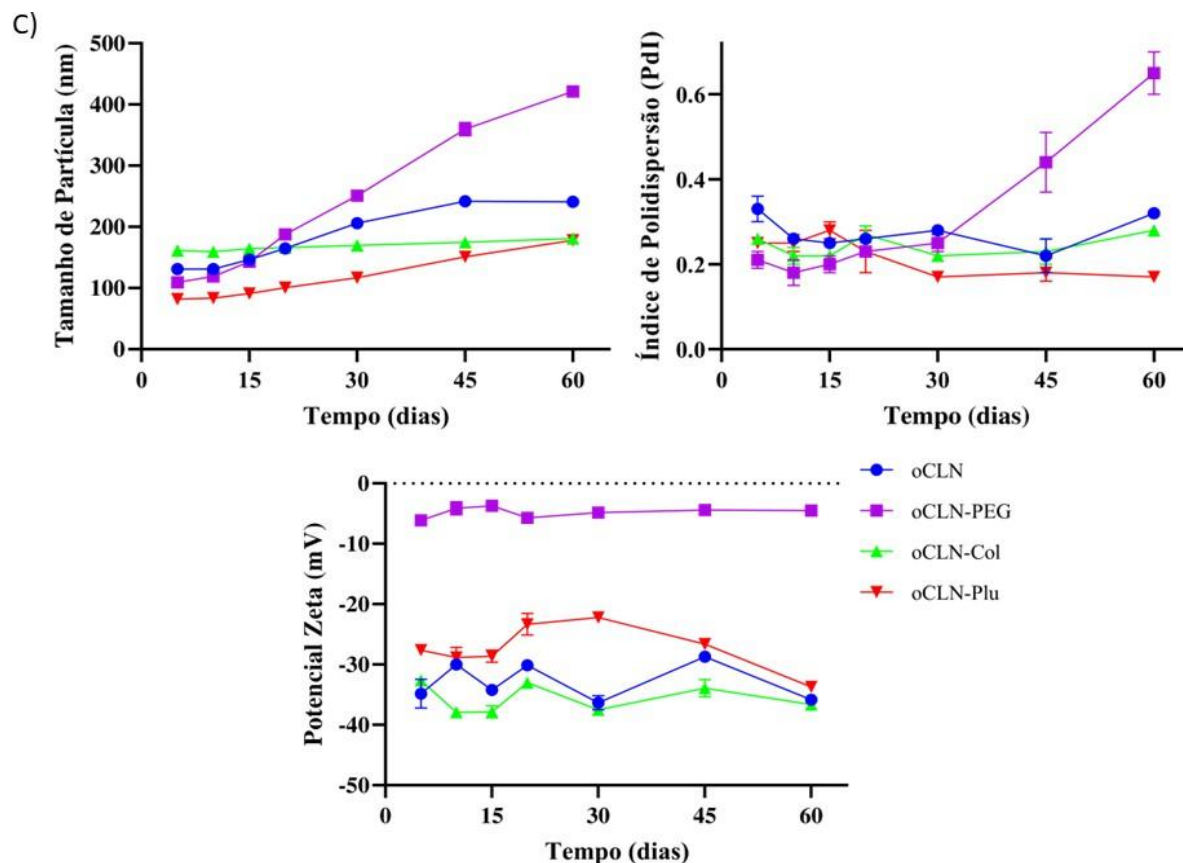
Figura 28. Estudo de estabilidade dos CLNs quando submetidos a temperatura de bancada (25 °C) (B) conforme resultados de análise de tamanho (nm), Pdl e potencial Zeta (mV)



Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por GraphPad Prism®. **Fonte:** Próprio autor, 2025. Produzido por GraphPad Prism®. oCLN (Carreador lipídico nanoestruturado otimizado). oCLN-PEG (Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com polietilenoglicol). oCLN-Col (Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com colesterol). oCLN-Plu (Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com Pluronic).

Finalmente, à temperatura de 37 °C (**Figura 29**), tanto a formulação otimizada quanto as funcionalizadas – principalmente oCLN-Col, atribuindo a maior estabilidade em estufa, e com exceção da oCLN-PEG -, mantiveram estabilidade relativa em relação ao tamanho das partículas, Pdl e aspectos macroscópicos até o 60º dia de armazenamento. oCLN-PEG, por sua vez, apresentou instabilidade significativa em temperatura de estufa a partir do 45º dia ($359,8 \pm 10,8$ nm e $0,44 \pm 0,07$), atingindo um estágio avançado de desestabilização no 60º dia ($421,3 \pm 8,5$ nm e $0,65 \pm 0,05$). Todas as formulações demonstraram estabilidade na carga de superfície, expressa pelo potencial Zeta, onde não houve diferenças estatisticamente significativas nos valores obtidos ao longo período de armazenamento.

Figura 29. Estudo de estabilidade dos CLNs quando submetidos a temperatura de estufa (37 °C) (C) conforme resultados de análise de tamanho (nm), PDI e potencial Zeta (mV)



Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por GraphPad Prism®. **Fonte:** Próprio autor, 2025. Produzido por GraphPad Prism®. oCLN (Carreador lipídico nanoestruturado otimizado). oCLN-PEG (Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com polietilenoglicol). oCLN-Col (Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com colesterol). oCLN-Plu (Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com Pluronic).

Conforme exposto, os dados demonstrados apresentados indicam a eficácia das formulações oCLN e oCLN-Plu em na manutenção da estabilidade por 60 dias à temperatura de 4 °C, correspondente ao armazenamento em geladeira. Somado a isso, oCLN-Col demonstrou estabilidade até no 60º dia à temperatura de 37 °C, referindo- se à condição de estufa. Em todas as temperaturas analisadas ao longo do período de estudo, oCLN-PEG revelou-se o sistema funcionalizado com maior instabilidade físico-química, sendo, portanto, mais suscetível à formação de agregados lipídicos e à separação de fases do carreador. À temperatura de 25 °C (ambiente), todas as formulações um processo gradativo instabilidade, evidenciado aumento do tamanho das partículas. No entanto, como não houve variações abruptas no decorrer do tempo, elas podem ser caracterizadas como estáveis até o 60º dia.

A estabilidade físico-química de um nanossistema lipídico é essencial para assegurar a eficácia na encapsulação e, conseqüentemente, a liberação controlada do ativo ou do fármaco encapsulado, reduzindo os riscos de degradação e preservando suas propriedades ao longo do

tempo (Mehta *et al.*, 2023; Queiroz; Muehlmann, 2024). Todavia, de maneira geral, a literatura indica que os sistemas lipídicos são mais suscetíveis à desestabilização físico-química e ao vazamento da matriz oleosa utilizada em sua composição, o que pode limitar a sua aplicabilidade (Laein *et al.*, 2024). Diante desse cenário, o revestimento superficial desses sistemas surgiu como uma estratégia viável e benéfica, permitindo a personalização da camada superficial das partículas, o que contribui para uma encapsulação mais eficiente do fármaco e favorece uma liberação direcionada mais precisa e eficaz (Gil-Gonzalo *et al.*, 2024; Shi; Duan; Ou, 2024).

No entanto, os resultados demonstram que a funcionalização com polietilenoglicol e, em determinadas temperaturas de armazenamento, com colesterol apresentou maior instabilidade em comparação com o carreador otimizado, divergindo de alguns dos estudos encontrados na literatura sobre o revestimento de superfície (Peng *et al.*, 2020; Lombardo *et al.*, 2022).

Em relação ao PEG, a literatura indica que sua cadeia molecular extensa promove impedimentos estéricos, minimizando a agregação das partículas (Kenekchukwu *et al.*, 2022). Além disso, estudos conduzidos por Petrovic; Bitá e Barbinta-Patrascu (2024) destacam o PEG como um agente funcionalizante eficaz, capaz de prolongar a meia-vida dos carreadores, proteger sua superfície e aprimorar sua estabilidade. No entanto, os resultados obtidos demonstram que esse polímero não conferiu uma estabilidade físico-química satisfatória, resultando em partículas com alterações significativas ao longo do tempo em todas as temperaturas de armazenamento avaliadas.

Seguindo essa linha de pensamento, o colesterol, em sistemas lipídicos, é incorporado à superfície das partículas com o objetivo de promover a interação do nanossistema com a bicamada lipídica e auxiliar na compactação do lipídio líquido que compõe o sistema (Mehta *et al.*, 2023). Essa característica confere ao colesterol a propriedade físico-química de reduzir o tamanho das partículas, tornando-as monodispersas e com maior perfil de internalização na célula-alvo (Albertsen *et al.*, 2022). A literatura aponta que o colesterol tende a aumentar a estabilidade da camada lipídica e preservar a integridade desses sistemas durante o armazenamento a longo prazo (Mehta *et al.*, 2023).

No entanto, esses efeitos podem variar conforme o peso molecular do colesterol, que pode influenciar o tamanho das partículas e, conseqüentemente, sua estabilidade. Apesar dessas considerações, os resultados obtidos neste estudo indicam que os carreadores revestidos com colesterol apresentaram estabilidade significativa em temperatura de estufa (37 °C), conforme demonstrado nos gráficos de estabilidade. Do ponto de vista estrutural, em temperaturas mais baixas (4 e 25 °C), a matriz lipídica tende a se tornar mais rígida ou a sofrer rearranjos que

favorecem a separação de fases, impactando negativamente a estabilidade do sistema e levando à sua desestabilização (Duché; Sanderson, 2024).

Para finalizar a funcionalização, o Pluronic® F-68, um copolímero não iônico anfifílico, tende a oferecer maior estabilidade, pois atua como um estabilizador estérico de membrana. Quando incorporado ao sistema, ele espessa a membrana lipídica, reduzindo a mobilidade dos lipídios e, conseqüentemente, melhorando a estabilidade do sistema (Mall *et al.*, 2024). Ademais, a literatura aponta que o Pluronic® também atua reduzindo a tensão superficial dos lipídios em sistemas emulsificados O/A, minimizando a deterioração do carreador e prolongando sua estabilidade (Jacob *et al.*, 2024). Esses efeitos podem explicar por que partículas revestidas com essa substância mantiveram estáveis em todas as três temperaturas avaliadas durante todo o período de armazenamento.

Quanto à formulação otimizada (oCLN), ela manteve-se estável nas temperaturas de geladeira e estufa (4 e 37 °C, respectivamente). Todavia, à temperatura de bancada (25 °C) o sistema apresentou mudanças significativas no tamanho das partículas, o que provavelmente se deve às variações ambientais ao longo do tempo, tornando o sistema mais suscetível a diversas variáveis. A literatura atribui esse aumento no tamanho das partículas à energia cinética, que favorece a frequência de colisão das partículas e a formação de agregados lipídicos, resultando em um nanossistema polidisperso e instável (Hutin *et al.*, 2022). Além disso, o processo de cristalização e a temperatura de fusão dos lipídios são parâmetros cruciais, pois podem impactar negativamente a estabilidade e estrutura superficial, comprometendo a interação entre os diferentes componentes do nanossistema (Uchôa *et al.*, 2025).

5.10 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH é baseado na capacidade da amostra de interagir com o radical orgânico estável DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). Esse ensaio é simples, rápido e sensível, permitindo a quantificação do poder redutor da amostra. No entanto, as suas limitações residem no fato de avaliar apenas essa propriedade específica. Durante o método realizado, os antioxidantes presentes na amostra reagem com o radical livre, resultando na mudança de coloração da solução, que passa de violeta para o amarelo. Dessa forma, a literatura demonstra que a capacidade antioxidante pode ser avaliada pela redução da absorbância, refletindo a perda de coloração do reagente DPPH• (Bibi Sadeer *et al.*, 2020; Flieger; Flieger, 2020).

Por outro lado, o método FRAP tem como objetivo determinar a capacidade de redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. Essa técnica é

amplamente aplicável a diversos alimentos, bebidas e substâncias puras, pois seus resultados são comparáveis a metodologias mais complexas, apresentando alta reprodutibilidade e forte brilho com os teores de grupos fenólicos. A atividade antioxidante de um composto é evidenciada pela redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} , promovendo uma mudança de coloração de azul-claro para azul-escuro. A capacidade antioxidante é observada, então, pelo acréscimo da absorbância (Munteanu; Apetrei, 2021).

Finalmente, o método ABTS baseia-se na geração do radical monocatión $\text{ABTS}^{\bullet+}$, que pode ser reduzido por compostos antioxidantes presentes nas amostras. Amplamente utilizado, trata-se de uma técnica capaz de avaliar a atividade antioxidante de compostos tanto hidrofílicos quanto lipofílicos. Durante a ocorrência, os antioxidantes neutralizam o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, promovendo uma descoloração gradual da solução, que passa de verde para incolor. Assim, a capacidade antioxidante é determinada pela redução da absorbância, refletindo a intensidade da descoloração do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (Cano *et al.*, 2023; Hwang; Lee, 2023).

Diante disso, o óleo essencial de orégano puro e as formulações, tanto a otimizada quanto as funcionalizadas, demonstraram capacidade antioxidante em todos os métodos experimentais desenvolvidos, $\text{ABTS}^{\bullet+}$, DPPH $\bullet$ e FRAP, com diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$), conforme apresentado na **Tabela 7**.

No método $\text{ABTS}^{\bullet+}$ as formulações oCLN e oCLN-Plu apresentaram capacidades antioxidantes com valores relativamente similares ($9,11 \pm 0,18$ e $8,89 \pm 0,16$ $\mu\text{mol/g}$, respectivamente) e superiores às de oCLN-PEG ($8,57 \pm 0,19$ $\mu\text{mol/g}$) e oCLN-Col ($8,29 \pm 0,23$ $\mu\text{mol/g}$). Por outro lado, o óleo essencial puro (OEO) apresentou valor de ABTS inferior ao óleo encapsulado ($7,38 \pm 0,26$ $\mu\text{mol/g}$). Com relação ao método DPPH $\bullet$ todas as formulações exibiram capacidade antioxidante, com valores entre $4,25 \pm 0,28$ e $4,63 \pm 0,61$ $\mu\text{mol/g}$, entanto, o óleo essencial puro obteve capacidade antioxidante superior ao ativo encapsulado ($7,09 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/g}$). Já no método FRAP, as formulações e o óleo essencial puro apresentaram diferenças na intensidade da atividade antioxidante em comparação com o método $\text{ABTS}^{\bullet+}$, seguindo a seguinte ordem: oCLN ($14,21 \pm 0,08$) > oCLN-PEG ($12,44 \pm 0,42$) > oCLN-Plu ($11,84 \pm 0,31$) > oCLN-Col ($11,25 \pm 0,40$) > OEO ($2,52 \pm 0,13$) (**Tabela 7**).

Tabela 7. Capacidade antioxidante dos nanossistemas lipídicos otimizados e funcionalizados contendo óleo essencial de orégano

Parâmetros	Formulações				
Capacidade Antioxidante	OEO	oCLN	oCLN-PEG	oCLN-Col	oCLN-Plu
ABTS• ⁺ (μmol/g)	7,38 ± 0,26 ^c	9,11 ± 0,18 ^a	8,57 ± 0,19 ^b	8,29 ± 0,23 ^b	8,89 ± 0,16 ^a
DPPH• (μmol/g)	7,09 ± 0,01 ^a	4,63 ± 0,61 ^b	4,35 ± 0,04 ^d	4,25 ± 0,28 ^e	4,42 ± 0,04 ^c
FRAP (μmol/g)	2,52 ± 0,13 ^e	14,21 ± 0,08 ^a	12,44 ± 0,42 ^b	11,25 ± 0,40 ^d	11,84 ± 0,31 ^c

Fonte: Próprio autor, 2025. Legenda: Resultados são expressos como média ± desvio padrão (n=3). Nota: a-e: letras minúsculas diferentes na mesma linha para a mesma média denotam diferenças ($p \leq 0,05$) na capacidade antioxidante, com base no teste de Tukey, ou no teste t de Student. Abreviaturas: ABTS•⁺, cátion-ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzeno-tiazolina)-6-sulfônico; DPPH•, 1,1-difenil-2 picrihidrazil; FRAP, capacidade de redução férrica do plasma; OEO, óleo essencial de orégano puro; oCLN, carreador lipídico nanoestruturado otimizado; oCLN- PEG, carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com polietilenoglicol (PEG); oCLN-Col, carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com colesterol; oCLN-Plu, carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com Pluronic® F-68.

A literatura já evidencia a atividade antioxidante do orégano, atribuindo essa propriedade, principalmente, à presença do composto carvacrol, além de linalol, p-cimeno, γ -terpineno e o-acetimol, cuja identificação foi confirmada neste estudo por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (CG-EM) (**Tabela 1**) (Kubiliene *et al.*, 2023). No entanto, apesar de resultar em elevada capacidade antioxidante, o óleo essencial de orégano é um antioxidante natural com elevada hidrofobicidade, o que limita a sua dispersão em meios aquosos e, em consequência disso, sua incapacidade de atravessar barreiras lipofílicas, dificultando a permeação celular e a biodisponibilidade sistêmica (Dell’Albani *et al.*, 2024).

A encapsulação de fármacos lipofílicos, como o óleo essencial de orégano, tem se destacado como uma estratégia promissora para superar suas limitações na aplicação terapêutica. Comparando os resultados obtidos sobre a capacidade antioxidante de óleos essenciais de orégano (grego e comum) e seus extratos hidroetanólicos, conforme descrito no estudo de Kosakowska *et al.* (2021), foi observada uma atividade antioxidante notável e superior à do óleo encapsulado em sistemas lipídicos. Essa diferença pode ser atribuída às características dos sistemas de liberação controlada, que modulam a disponibilidade do ativo e sua interação com o meio.

Com isso, no presente estudo, a avaliação da capacidade antioxidante pelo ensaio DPPH• revelou que o óleo essencial puro (OEO) apresentou uma atividade superior à forma nanoencapsulado. Esse resultado pode ser atribuído à natureza lipofílica do óleo essencial, que favorece sua interação direta com o radical DPPH•, ou uma possível limitação do método para avaliar nanopartículas, uma vez que se trata de um sistema lipídico nanoestruturado disperso em meio aquoso, o que pode retardar a formação dos ativos (Chen *et al.*, 2023). Segundo

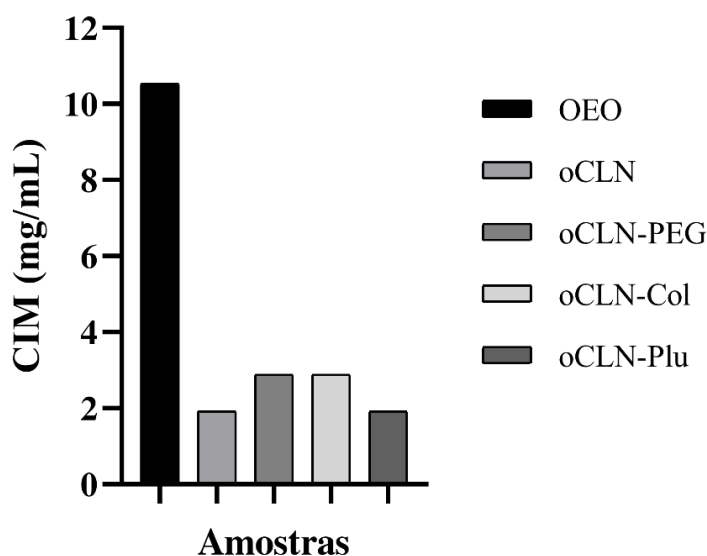
Walasek-Janusz *et al.* (2024), a elevada atividade do OEO no ensaio DPPH• está associada à presença de carvacrol e timol em sua composição, compostos capazes de capturar radicais livres e os estabilizar por ressonância, inativando sua reatividade.

No presente estudo, foram identificados por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas o carvacrol e o acetato de timol como compostos predominantes. Com isso, a literatura relata que à presença de um anel aromático nessas moléculas representa um menor potencial de redução em relação aos radicais livres e atuam como doadores de hidrogênio por meio do grupo hidroxila ligado ao anel aromático, contribuindo para a neutralização dos radicais (Mendonça *et al.*, 2022; Jomova *et al.*, 2023).

5.11 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial puro e das formulações oCLN, oCLN-PEG, oCLN-Col e oCLN-Plu frente a cepas alvo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase-negativa* e *Escherichia coli* foram determinadas como uma etapa de triagem inicial para avaliar suas propriedades antibacterianas. O óleo essencial puro apresentou uma CIM de 10,53 mg/mL, enquanto as formulações oCLN e oCLN-Plu apresentaram maior eficácia e um efeito mais pronunciado, com CIM de 1,92 mg/mL. Em comparação, oCLN-Col e oCLN-PEG apresentaram CIM de 2,88 mg/mL. Esse dado foi consistente para todos os microrganismos patogênicos isolados de mastite bovina que foram testados, sendo os seus resultados expressos na **Figura 30**.

Figura 30. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de orégano e das formulações otimizada e funcionalizadas frente às linhagens bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase-negativa* e *Escherichia coli*



Fonte: Próprio autor, 2025. Produzido por GraphPad Prism[®]. oCLN (Carreador lipídico nanoestruturado otimizado). oCLN-PEG (Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com polietilenoglicol. oCLN-Col (Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com colesterol). oCLN-Plu (Carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com Pluronic. CIM: Concentração inibitória mínima.

Um estudo conduzido por Elbouzidi *et al.* (2025) avaliou a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de tomilho, lavanda e orégano contra as cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados obtidos indicaram valores de CIM entre 0,25-0,5% v/v para o óleo de tomilho, 1-2% v/v para o de lavanda e 2% v/v para o de orégano. Esses dados sugerem que o óleo essencial de tomilho apresenta a maior atividade antimicrobiana, seguido pelo de lavanda, enquanto o de orégano demonstrou menor eficácia. É importante ressaltar que a eficiência de ação dos óleos essenciais pode variar conforme a sua composição, influenciada por fatores como período de coleta, controle de qualidade e a linhagem bacteriana testada.

A literatura de Sidiropoulou *et al.* (2022) & Elbouzidi *et al.* (2025) afirmam que os óleos essenciais ricos em monoterpenoides possuem maior eficácia contra bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*. Esse efeito pode ser atribuído ao óleo essencial de orégano, cuja composição majoritária de carvacrol e timol confere alta afinidade pelas membranas bacterianas, permitindo sua interação com a bicamada lipídica e alterando sua fluidez e permeabilidade. Além disso, os monoterpenos induzem estresse oxidativo e inibem enzimas essenciais para a sobrevivência bacteriana, levando à morte celular. Apesar da espessa camada de peptidoglicano, a ausência de uma membrana externa protetora torna as Gram-positivas mais suscetíveis à degradação após a interação com esses compostos. No que tange às bactérias Gram-negativas, estudos evidenciam que a absorção de monoterpenos é determinada pela permeabilidade do envelope externo do microrganismo em questão (Silhavy; Kahne; Walker, 2010; Maher; Hassan, 2023).

No entanto, apesar de benéfico, os óleos essenciais aplicados puros podem apresentar elevada volatilidade e capacidade oxidativa, além de sua hidrofobicidade alta quando administrado em fluídos biológicos (Cesca *et al.*, 2024). Em vista disso, o encapsulamento dos óleos essenciais em carreadores lipídicos nanoestruturados tornou-se uma alternativa viável, sustentável e segura a fim de aprimorar ao ativo uma maior biocompatibilidade, entrega direcionada e um efeito de liberação controlada, minimizando os riscos ao indivíduo, e efetivando suas funções biológicas (Sharma *et al.*, 2022).

Pires *et al.* (2024) desenvolveram um estudo visando a produção de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo óleo essencial para avaliar sua atividade antimicrobiana contra *Campylobacter* spp. isolados de carcaças de frango. Foram testados diversos óleos

essenciais, incluindo orégano, copaíba, lavanda, capim-limão e canela. Para o óleo essencial de orégano, foi formulada uma nanopartícula contendo esse óleo como lipídio líquido (5%) e cera de abelha como lipídio sólido (8%), estabilizado pelo surfactante Pluronic® F-68 (5%). Essa formulação demonstrou inibição do crescimento da maioria das cepas de *Campylobacter* spp. em baixas concentrações (0,2-4,0 mg/mL). Os dados de Pires *et al.* (2024) são compatíveis com o presente estudo, uma vez que as formulações oCLN e oCLN-Plu apresentaram CIM de 1,92 mg/mL, enquanto oCLN-PEG e oCLN-Col atingiram 2,88 mg/mL.

Os resultados obtidos para o óleo essencial de orégano puro (CIM: 10,53 mg/mL) revelaram uma atividade significativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, corroborando os achados de Elbouzidi *et al.* (2025), que destacaram sua capacidade de penetrar na célula bacteriana e induzir a morte celular. No entanto, apesar da eficácia observada, a concentração inibitória do óleo foi inferior às formulações desenvolvidas, especialmente oCLN e oCLN-Plu. Esse resultado sugere que, no organismo hospedeiro, o óleo essencial de orégano tende a sofrer maior manipulação e perda de suas propriedades.

|Considerando que todas as formulações continham 10 mg/mL de OEO, a diferença observada entre elas se deu no revestimento da superfície das partículas. Neste contexto, a formulação otimizada e a funcionalizada com Pluronic® F-68 apresentaram melhor atividade antimicrobiana. Esse efeito pode ser atribuído à composição estrutural dos monoterpenos e à interação do surfactante com a bicamada lipídica, favorecendo maior permeabilidade na membrana bacteriana e resultando na morte celular (Escobar *et al.*, 2020; Takegawa *et al.*, 2025).

Por outro lado, o polietilenoglicol (PEG) (oCLN-PEG) e o colesterol (oCLN-Col) apresentaram efeitos menos evidentes, podendo ser devido às suas características estruturais. Diferentemente dos monoterpenos e tensoativos, o colesterol se insere na bicamada lipídica, aumentando sua rigidez e reduzindo a fluidez da membrana, o que resulta em uma menor permeabilidade celular e, consequentemente, menor atividade antimicrobiana em comparação a outros componentes (Chakraborty *et al.*, 2020; Utterström *et al.*, 2022; Aranda; Teruel; Ortiz, 2023). Já o PEG exerce um efeito estérico, criando uma barreira ao redor do carreador, dificultando sua adesão à membrana bacteriana e reduzindo a interação do ativo com a célula-alvo (Padín-González *et al.*, 2022). Além disso, nem o PEG nem o colesterol apresentam ação direta sobre o metabolismo bacteriano, pois não inibem enzimas essenciais, limitando assim seu impacto na viabilidade celular.

Apesar de apresentar menor CIM e necessitar de uma maior quantidade da formulação, o polietilenoglicol e o colesterol desempenham um papel essencial na formulação do nanossistema. A PEGulação prolonga o tempo de circulação dos agentes terapêuticos, sendo

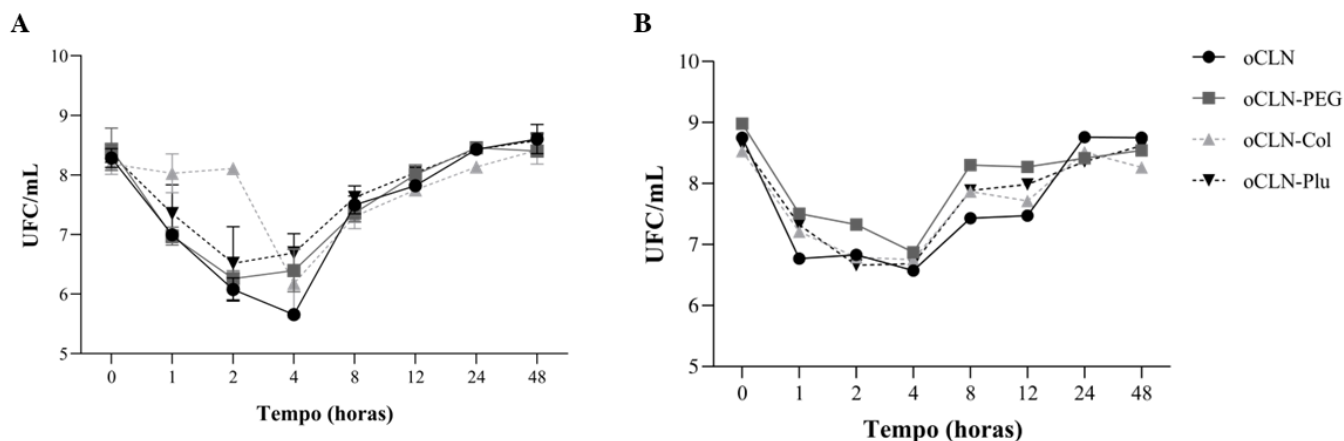
fundamental para nanocarreadores de liberação controlada, além de aumentar a hidrofiliabilidade e reduzir a depuração renal, favorecendo a estabilidade e eficácia do sistema (Alvi *et al.*, 2022). O colesterol, por sua vez, é um componente integral das membranas celulares eucariotas e atua promovendo a compactação do óleo na matriz lipídica estabilizada por tensoativos, conferindo uma estrutura amorfa e desorganizada. Esse efeito influencia na obtenção de partículas monodispersas e com um maior encapsulamento do fármaco (Albertsen *et al.*, 2022; Mehta *et al.*, 2023).

5.12 CINÉTICA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

Considerando a avaliação do efeito da CIM sobre a viabilidade celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como a relevância dessas linhagens bacterianas no acometimento da mastite bovina ambiental e infecciosa, as cepas de *S. aureus* e *E. coli* foram selecionados para inclusão em experimentos subsequentes.

Os efeitos de oCLN (CIM: 1,92 mg/mL), oCLN-PEG (CIM: 2,88 mg/mL), oCLN-Col (CIM: 2,88 mg/mL) e oCLN-Plu (CIM: 1,92 mg/mL) sobre as contagens de células viáveis das cepas alvo estão apresentados na **Figura 31 e nas Tabelas 8 e 9**. Todas as formulações promoveram reduções significativas na contagem de células viáveis durante 12 horas de exposição ($P < 0,001$) independentemente da cepa testada. A redução da contagem viável ≥ 2 log (ou seja, $\geq 99\%$ de redução da contagem inicial viável) foi causada pela maioria das formulações após 4 horas de exposição. Em ênfase observou-se, ainda, uma redução > 1 log logo após 2 horas de exposição, principalmente quando as cepas foram expostas a oCLN e oCLN-Plu. Além disso, a menor contagem foi observada frente a *S. aureus* após 4 horas de exposição a oCLN ($5,66 \pm 0,07$ UFC/mL; redução ≥ 3 log) (**Tabela 8**). As reduções nas contagens de células viáveis das cepas testadas no tempo zero (linha de base) foram comparadas com aquelas após cada tempo de exposição pré-estabelecido às formulações oCLN a oCLN-Plu.

Figura 31. Contagem de células viáveis de *Staphylococcus aureus* 700 (a) e *Escherichia coli* 843 (b) em função da exposição a carreadores lipídicos nanoestruturados otimizado e funcionalizados com óleo essencial de orégano



Fonte: Próprio autor, 2025.

Tabela 8. Contagem de colônias viáveis de *Staphylococcus aureus* 700 após tempo de exposição de 48h a carreadores lipídicos nanoestruturados otimizado e funcionalizados com óleo essencial de orégano

<i>S. aureus</i> 700				
Tempo (horas)	oCLN	oCLN-PEG	oCLN-Col	oCLN-Plu
0	8,28 ± 0,16 Aa	8,43 ± 0,36 Aa	8,19 ± 0,18 Aa	8,35 ± 0,14 ABa
1	7,00 ± 0,05 Cb	6,97 ± 0,15 Cb	8,03 ± 0,33 Ba	7,35 ± 0,48 CDb
2	6,08 ± 0,19 Db	6,26 ± 0,13 Db	8,11 ± 0,07 ABa	6,52 ± 0,61 Db
4	5,66 ± 0,07 Eb	6,40 ± 0,36 Da	6,18 ± 0,58 Ca	6,69 ± 0,32 Da
8	7,50 ± 0,15 Ba	7,36 ± 0,14 Ca	7,30 ± 0,20 Ba	7,62 ± 0,19 BCa
12	7,82 ± 0,07 Ba	8,01 ± 0,17 Ba	7,75 ± 0,09 Ba	8,04 ± 0,05 ABCa
24	8,43 ± 0,10 Aa	8,46 ± 0,08 Aa	8,13 ± 0,08 Ab	8,43 ± 0,06 Aa
48	8,60 ± 0,25 Aa	8,40 ± 0,08 ABa	8,42 ± 0,24 Aa	8,58 ± 0,13 Aa

Fonte: Próprio autor, 2025. Legenda: Resultados são expressos como média ± desvio padrão (n=3). Nota: a-b: letras minúsculas diferentes na mesma linha para a mesma média denotam diferenças ($p \leq 0,05$). Diferentes letras maiúsculas sobrescritas (A-E) na mesma coluna denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as formulações para a mesma cepa: oCLN, carreador lipídico nanoestruturado otimizado; oCLN-PEG, carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com polietilenoglicol (PEG); oCLN-Col, carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com colesterol; oCLN-Plu, carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com Pluronic® F-68.

Tabela 9. Contagem de colônias viáveis de *Escherichia coli* 843 após tempo de exposição de 48h a carreadores lipídicos nanoestruturados otimizado e funcionalizados com óleo essencial de orégano

<i>E. coli</i> 843				
Tempo (horas)	oCLN	oCLN-PEG	oCLN-Col	oCLN-Plu
0	8,76 ± 0,27 ^{Aa}	8,99 ± 0,07 ^{Aa}	8,53 ± 0,53 ^{Aa}	8,63 ± 0,43 ^{Aa}
1	6,77 ± 0,21 ^{Bb}	7,50 ± 0,21 ^{Da}	7,21 ± 0,14 ^{CDab}	7,30 ± 0,15 ^{DEa}
2	6,83 ± 0,09 ^{Bb}	7,33 ± 0,18 ^{DEa}	6,79 ± 0,17 ^{Db}	6,66 ± 0,18 ^{Fb}
4	6,57 ± 0,22 ^{Bb}	6,87 ± 0,13 ^{Ea}	6,75 ± 0,23 ^{Dab}	6,68 ± 0,30 ^{EFab}
8	7,42 ± 0,28 ^{Bb}	8,30 ± 0,14 ^{Ba}	7,87 ± 0,05 ^{Bab}	7,89 ± 0,09 ^{CDab}
12	7,47 ± 0,18 ^{Bc}	8,27 ± 0,17 ^{Ca}	7,72 ± 0,19 ^{BCb}	7,98 ± 0,08 ^{BCab}
24	8,75 ± 0,08 ^{Aa}	8,42 ± 0,31 ^{Aa}	8,51 ± 0,19 ^{Aa}	8,35 ± 0,12 ^{ABCa}
48	8,75 ± 0,37 ^{Aa}	8,54 ± 0,25 ^{Aa}	8,26 ± 0,15 ^{ABa}	8,61 ± 0,15 ^{ABa}

Fonte: Próprio autor, 2025. Legenda: Resultados são expressos como média ± desvio padrão (n=3). Nota: a-c: letras minúsculas diferentes na mesma linha para a mesma média denotam diferenças ($p \leq 0,05$). Diferentes letras maiúsculas sobrescritas (A-F) na mesma coluna denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as formulações para a mesma cepa: oCLN, carreador lipídico nanoestruturado otimizado; oCLN-PEG, carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com polietilenoglicol (PEG); oCLN-Col, carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com colesterol; oCLN-Plu, carreador lipídico nanoestruturado funcionalizado com Pluronic[®] F-68.

Observou-se, a partir dos resultados, a eficácia da formulação otimizada (oCLN) e das formulações funcionalizadas (oCLN-PEG, oCLN-Col e oCLN-Plu) encapsuladas com óleo essencial de orégano na inibição das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, evidenciada por uma redução significativa causada por oCLN ≥ 3 log UFC/mL após 4 horas de exposição. Nesse contexto, a literatura descreve que os produtos derivados de compostos fitoquímicos naturais possuem um potente efeito bactericida sobre microrganismos-alvo, enquanto reduções < 3 log indicam uma ação bacteriostática (Khameneh *et al.*, 2021; Masyita *et al.*, 2022).

Diante disso, os resultados do presente estudo corroboram essa premissa, demonstrando que a formulação otimizada apresentou a melhor cinética de morte celular bacteriana, caracterizando um efeito bactericida. Em contrapartida, as formulações funcionalizadas exibiram uma redução microbiana < 3 log, proporcionando predominantemente um efeito bacteriostático. Esses achados sugerem que a funcionalização dos carreadores pode modular a atividade antimicrobiana do nanossistemas, possivelmente interferindo na interação entre o óleo essencial de orégano e as membranas bacterianas, fato já justificado e correlacionado com a literatura a partir dos resultados de CIM (Da Costa Lima *et al.*, 2022).

Considerações Finais

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a recorrência de quadros infecciosos resistentes aos antimicrobianos convencionais em doenças que acometem à saúde pública, como a mastite bovina, carreadores lipídicos nanoestruturados contendo óleo essencial de orégano otimizados e funcionalizados demonstraram ser uma alternativa promissora, segura e eficaz no combate à mastite bovina. O óleo essencial de orégano apresentou o carvacrol como composto majoritário. Estudos de pré-formulação através da técnica de emulsificação quente seguida de sonicação produziram nanossistemas monodispersos em escala nanométrica na presença de concentrações proporcionais de lipídio sólido (cera de abelha: 1%) e lipídio líquido (óleo essencial de orégano: 1%) e altas concentrações do tensoativo hidrofílico Tween[®] 80 (3%). O CLN otimizado foi submetido à modificação de superfície com polietilenoglicol (PEG), colesterol e Pluronic[®] F-68 em diferentes concentrações, o que induziu variações no tamanho das partículas, no índice de polidispersão e no potencial Zeta, as quais permaneceram relativamente estáveis por 60 dias a 37°C, com exceção da oCLN-PEG. A alta eficiência de encapsulação do óleo de orégano (> 97%) e a predominância da sua compactação no lipídio sólido foi comprovada através de técnicas físico-químicas. Por fim, as formulações foram avaliadas quanto ao seu efeito de inibição mínima em cepas patogênicas da mastite, bem como a sua cinética de morte e sua atividade antioxidante. A formulação otimizada (oCLN) e a funcionalizada Pluronic[®] F-68 (oCLN-Plu) apresentaram melhor ação antimicrobiana com valor de CIM de 1,92 mg/mL para todas as linhagens bacterianas testadas. Ao passo que, para a análise da curva de morte, a formulação otimizada demonstrou resultados mais promissores frente a *Staphylococcus aureus* após 4 horas de exposição ($5,66 \pm 0,07$ UFC/mL; redução ≥ 3 log), indicando seu efeito bactericida para a mastite bovina. Corroborando com isso, no que tange à atividade antioxidante, oCLN e oCLN-Plu apresentaram capacidades antioxidantes semelhantes pelo método ABTS. No método FRAP ressalta-se que oCLN foi o nanossistema produzido que demonstrou melhor atividade. Apesar de ambos os sistemas demonstrarem dentro dos objetivos esperados, pode-concluir que a funcionalização dos carreadores pode modular a atividade antimicrobiana do nanossistemas, possivelmente interferindo na interação entre o óleo essencial de orégano e as membranas bacterianas, ressaltando, assim, neste caso, a melhor eficiência dos carreadores otimizados. Portanto, este sistema nanotecnológico funcionalizado e projetado com características compatíveis promete aplicações futuras no tratamento da doença inflamatória do gado leiteiro.

Referências

7. REFERÊNCIAS

- ABAS, Muhammad *et al.* Analyzing surface roughness variations in material extrusion additive manufacturing of nylon carbon fiber composites. **Polymers**, v. 15, n. 17, p. 3633, 2023.
- AFFRAM, Kevin O. *et al.* Cytotoxic effects of gemcitabine-loaded solid lipid nanoparticles in pancreatic cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, p. 101374, 2020.
- AGMO HERNÁNDEZ, Víctor. An overview of surface forces and the DLVO theory. **ChemTexts**, v. 9, n. 4, p. 10, 2023.
- AGUIAR, Renata Amanda Carneiro *et al.* *Staphylococcus aureus* isolated from traditional artisanal raw milk cheese from Southern Brazil: Diversity, virulence, and antimicrobial resistance profile. **Journal of Food Protection**, v. 87, n. 6, p. 100285, 2024.
- AGUILAR-PÉREZ, Katya M. *et al.* Synthesis and nano-sized characterization of bioactive oregano essential oil molecule-loaded small unilamellar nanoliposomes with antifungal potentialities. **Molecules**, v. 26, n. 10, p. 2880, 2021.
- AJIBOYE, Adejumo Lara *et al.* Olanzapine loaded nanostructured lipid carriers via high shear homogenization and ultrasonication. **Scientia Pharmaceutica**, v. 89, n. 2, p. 25, 2021.
- AKOMBAETWA, Nakamwi *et al.* Current advances in lipid nanosystems intended for topical and transdermal drug delivery applications. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 656, 2023.
- AL-JIPOURI, Ali *et al.* Liposomes or extracellular vesicles: a comprehensive comparison of both lipid bilayer vesicles for pulmonary drug delivery. **Polymers**, v. 15, n. 2, p. 318, 2023.
- AL-THANI, Alshayma N. *et al.* Nanoparticles in cancer theragnostic and drug delivery: A comprehensive review. **Life Sciences**, p. 122899, 2024.
- ALAMOUDI, Jawaher Abdullah *et al.* Chitosan/hesperidin nanoparticles formulation: a promising approach against ethanol-induced gastric ulcers via Sirt1/FOXO1/PGC-1 α /HO-1 pathway. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, p. 1433793, 2024.
- ALAVI, Seyed Ebrahim *et al.* PEG-grafted liposomes for enhanced antibacterial and antibiotic activities: An *in vivo* study. **NanoImpact**, v. 25, p. 100384, 2022.
- ALBERTSEN, Camilla Hald *et al.* The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. **Advanced Drug Ddelivery Reviews**, v. 188, p. 114416, 2022.
- ALGHARIB, Samah Attia; DAWOOD, Ali; XIE, Shuyu. Nanoparticles for treatment of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Drug Delivery**, v. 27, n. 1, p. 292-308, 2020.
- ALRUSHAID, Noor *et al.* Nanotechnology in cancer diagnosis and treatment. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 3, p. 1025, 2023.
- ALTAMMAR, Khadijah A. A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1155622, 2023.

APOSTOLOU, Maria *et al.* The effects of solid and liquid lipids on the physicochemical properties of nanostructured lipid carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 110, n. 8, p. 2859-2872, 2021.

ARANDA, Francisco J.; TERUEL, José A.; ORTIZ, Antonio. Recent advances on the interaction of glycolipid and lipopeptide biosurfactants with model and biological membranes. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, p. 101748, 2023.

ARSÈNE, Mbarga Manga Joseph *et al.* The public health issue of antibiotic residues in food and feed: Causes, consequences, and potential solutions. **Veterinary World**, v. 15, n. 3, p. 662, 2022.

ASHRAF, Aqeela; IMRAN, Muhammad. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. **Animal Health Research Reviews**, v. 21, n. 1, p. 36-49, 2020.

ASHRAF, Aqeela; IMRAN, Muhammad. Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. **Tropical Animal Health and Production**, v. 50, p. 1193-1202, 2018.

ATANASOV, Atanas G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200-216, 2021.

AVULA, Purnachandra Rao *et al.* Design, formulation, *in-vitro* and *in-vivo* pharmacokinetic evaluation of Nicardipine-nanostructured lipid carrier for transdermal drug delivery system. **Materials today: Proceedings**, 2023.

BALDIM, Iara *et al.* Nanostructured lipid carriers loaded with *Lippia sidoides* essential oil as a strategy to combat the multidrug-resistant *Candida auris*. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 1, p. 180, 2022.

BARATHE, Pramod *et al.* Antibiotic pollution and associated antimicrobial resistance in the environment. **Journal of Hazardous Materials Letters**, p. 100105, 2024.

BARREIRO, Juliana Regina *et al.* Non-culture-based identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 2928-2934, 2017.

BAZARGANI, Arya *et al.* Pegylated solid lipid nanoparticles for the intranasal delivery of combination antiretroviral therapy composed of Atazanavir and Elvitegravir to treat NeuroAIDS. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 125166, 2025.

BHARTI, Deepti *et al.* Effects of sorbitan monostearate and stearyl alcohol on the physicochemical parameters of sunflower-wax-based oleogels. **Gels**, v. 8, n. 8, p. 520, 2022.

BHATTARAI, Dinesh *et al.* Mechanism of pattern recognition receptors (PRRs) and host pathogen interplay in bovine mastitis. **Microbial Pathogenesis**, v. 120, p. 64-70, 2018.

BI, Yannan *et al.* *Staphylococcus aureus* induces mammary gland fibrosis through activating the TLR/NF- κ B and TLR/AP-1 signaling pathways in mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, p. 104427, 2020.

BIBI SADEER, Nabeelah *et al.* The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 709, 2020.

BRANDELLI, Adriano; LOPES, Nathalie Almeida; PINILLA, Cristian Mauricio Barreto. Nanostructured antimicrobials for quality and safety improvement in dairy products. **Foods**, v. 12, n. 13, p. 2549, 2023.

BUKKE, Sarad Pawar Naik *et al.* Solid lipid nanocarriers for drug delivery: design innovations and characterization strategies—a comprehensive review. **Discover Applied Sciences**, v. 6, n. 6, p. 279, 2024.

BUNSE, Marek *et al.* Essential oils as multicomponent mixtures and their potential for human health and well-being. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 956541, 2022.

BURDUŞEL, Alexandra-Cristina *et al.* Inorganic nanoparticles in bone healing applications. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 4, p. 770, 2022.

BUROVIĆ, Jasmin. Izolacija bakterijskih patogena kod klinički manifestnih mastitisa mliječnih goveda i njihova antimikrobna osjetljivost u zeničkoj regiji u 2017. godini. **Veterinarska Stanica**, v. 51, n. 1, 2020.

CACCIATORE, Fabíola Ayres *et al.* Carvacrol encapsulation into nanostructures: Characterization and antimicrobial activity against foodborne pathogens adhered to stainless steel. **Food Research International**, v. 133, p. 109143, 2020.

CAMPANHOLI, Katieli da Silva Souza *et al.* Copaiba oil-based emulsion as a natural chemotherapeutic agent for the treatment of bovine mastitis: *In vivo* studies. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 346, 2023.

CANDIDO DOS SANTOS, Kelinton; MALFITANO CARVALHO, Stephan; FREIRE CARVALHO, César. Application of analytical techniques, physicochemical and thermal analysis for detecting the presence of paraffin in beeswax (*Apis mellifera* Linnaeus). **Revista Foco (Interdisciplinary Studies Journal)**, v. 17, n. 12, 2024.

CANESCHI, Alice *et al.* Plant essential oils as a tool in the control of bovine mastitis: An update. **Molecules**, v. 28, n. 8, p. 3425, 2023.

CANO, Antonio *et al.* ABTS/TAC methodology: Main milestones and recent applications. **Processes**, v. 11, n. 1, p. 185, 2023.

CESCA, Rafaela Silva *et al.* Advances and perspectives on the application of essential oils in food packaging films, coatings, and nanoencapsulated materials. **Bragantia**, v. 83, p. e20230132, 2024.

CHAACHOUAY, Nouredine; ZIDANE, Lahcen. Plant-derived natural products: a source for drug discovery and development. **Drugs and Drug Candidates**, v. 3, n. 1, p. 184-207, 2024.

CHAKRABORTY, Saptarshi *et al.* How cholesterol stiffens unsaturated lipid membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 36, p. 21896-21905, 2020.

CHAUHAN, Iti *et al.* Nanostructured lipid carriers: A groundbreaking approach for transdermal drug delivery. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 10, n. 2, p. 150, 2020.

CHEN, Xiaohua *et al.* Antioxidant activities of essential oils and their major components in

scavenging free radicals, inhibiting lipid oxidation and reducing cellular oxidative stress. **Molecules**, v. 28, n. 11, p. 4559, 2023.

CHEN, Xu *et al.* Advances in surface functionalization of next-generation metal-organic frameworks for biomedical applications: design, strategies, and prospects. **Chem**, v. 10, n. 2, p. 504-543, 2024.

CHENG, Wei Nee; HAN, Sung Gu. Bovine mastitis: Risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments—A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 33, n. 11, p. 1699, 2020.

CIMINO, Cinzia *et al.* Essential oils: Pharmaceutical applications and encapsulation strategies into lipid-based delivery systems. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 3, p. 327, 2021.

CORREIA, A. C. *et al.* Design of experiment (DoE) of mucoadhesive valproic acid-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for potential nose-to-brain application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 664, p. 124631, 2024.

DE CARO, Viviana *et al.* Hybrid nanocomposite mini-tablet to be applied into the post-extraction socket: Matching the potentialities of resveratrol-loaded lipid nanoparticles and hydroxyapatite to promote alveolar wound healing. **Pharmaceutics**, v. 17, n. 1, p. 112, 2025.

DA COSTA LIMA, M. *et al.* Phenolic-rich extracts from acerola, cashew apple and mango by-products cause diverse inhibitory effects and cell damages on enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 565-577, 2022.

DE SÁ FILHO, José Carlos Freitas *et al.* Geographic location and seasonality affect the chemical composition of essential oils of *Lippia alba* accessions. **Industrial Crops and Products**, v. 188, p. 115602, 2022.

DE SOUSA, Damião P. *et al.* Essential oils: Chemistry and pharmacological activities. **Biomolecules**, v. 13, n. 7, p. 1144, 2023.

DE SOUZA, Aline *et al.* A new medium-throughput screening design approach for the development of hydroxymethylnitrofurazone (NFOH) nanostructured lipid carrier for treating leishmaniasis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 193, p. 111097, 2020.

DEBRUYN, Ella *et al.* Alternative approaches for bovine mastitis treatment: A critical review of emerging strategies, their effectiveness and limitations. **Research in Veterinary Science**, p. 105557, 2025.

DELL'ALBANI, Paola *et al.* Effect of ferulic acid loaded in nanoparticle on tissue transglutaminase expression levels in human glioblastoma cell line. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 15, p. 8397, 2024.

DOMINGUES, Joana M. *et al.* Nanoparticle synthesis and their integration into polymer-based fibers for biomedical applications. **Biomedicines**, v. 11, n. 7, p. 1862, 2023.

DUARTE, Ana Paula; LUÍS, Ângelo; GALLARDO, Eugenia. Natural products: Therapeutic properties and beyond II. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6140, 2022.

DUCHÉ, Genevieve; SANDERSON, John M. The chemical reactivity of membrane lipids. **Chemical Reviews**, v. 124, n. 6, p. 3284-3330, 2024.

EGYEDY, Ashley F.; AMETAJ, Burim N. Mastitis: Impact of dry period, pathogens, and immune responses on Etiopathogenesis of disease and its association with Periparturient diseases. **Dairy**, v. 3, n. 4, p. 881-906, 2022.

EKIERT, Halina Maria; SZOPA, Agnieszka. Biological activities of natural products. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5769, 2020.

EL-SAYED, Amr *et al.* Molecular biological tools applied for identification of mastitis causing pathogens. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 5, n. 2, p. 89-97, 2017.

EL-SAYED, Amr; KAMEL, Mohamed. Bovine mastitis prevention and control in the post-antibiotic era. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, p. 1-16, 2021.

ELBASTAWESY, Asmaa *et al.* Prevalence of potentially pathogenic and antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in raw milk and dairy products in Egypt. **International Dairy Journal**, v. 162, p. 106145, 2025.

ELBEHIRY, Ayman *et al.* Antibacterial effects and resistance induction of silver and gold nanoparticles against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis and the potential toxicity in rats. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 4, p. e00698, 2019.

ELBOUZIDI, Amine *et al.* Optimization of the antibacterial activity of a three-component essential oil mixture from moroccan *Thymus satureioides*, *Lavandula angustifolia*, and *Origanum majorana* using a simplex-centroid design. **Pharmaceuticals**, v. 18, n. 1, p. 57, 2025.

ELMI, Abdirahman *et al.* Evaluation of antioxidant and antibacterial activities, cytotoxicity of *Acacia seyal* Del bark extracts and isolated compounds. **Molecules**, v. 25, n. 10, p. 2392, 2020.

ELMOWAFY, Mohammed *et al.* Polymeric nanoparticles for delivery of natural bioactive agents: recent advances and challenges. **Polymers**, v. 15, n. 5, p. 1123, 2023.

ELY, V. L. *et al.* Activity of biogenic silver nanoparticles against isolates of Prototheca species from bovine mastitis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 24-28, 2022.

ENDALE, Habtamu; MATHEWOS, Mesfin; ABDETA, Debela. Potential causes of spread of antimicrobial resistance and preventive measures in one health perspective-a review. **Infection and Drug Resistance**, p. 7515-7545, 2023.

ERDEM, Ferit; KANDEMIR, Halil; ALP, F. Burcu. Effect of polycaprolactone, zinc oxide, and poly (ethylene glycol) on the properties of polylactic acid composite fibers obtained by melt electrospinning. **ACS Omega**, 2025.

ESCOBAR, Angelica *et al.* Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 12, p. 9243-9269, 2020.

FERRONATTO, José A. *et al.* Diagnosing mastitis in early lactation: use of Somaticell®,

California mastitis test and somatic cell count. **Italian Journal of Animal Science**, v. 17, n. 3, p. 723-729, 2018.

EZIKE, Tobechukwu Christian *et al.* Advances in drug delivery systems, challenges and future directions. **Heliyon**, v. 9, n. 6, 2023.

FAN, Xu *et al.* Oregano essential oil encapsulated in zein-pectin-chitosan nanoparticles to improve the storage quality of Harbin red sausage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 266, p. 131322, 2024.

FARHADI, Kousha *et al.* Thymol and carvacrol against *Klebsiella*: anti-bacterial, anti-biofilm, and synergistic activities—a systematic review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, p. 1487083, 2024.

FLIEGER, Jolanta; FLIEGER, Michał. The [DPPH•/DPPH-H]-HPLC-DAD method on tracking the antioxidant activity of pure antioxidants and goutweed (*Aegopodium podagraria* L.) hydroalcoholic extracts. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 6005, 2020.

FU, Yunhe *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.

GAO, Pan *et al.* Effects of different oleogelators on the structural properties and composition of iron walnut-oil oleogels. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 102, p. 106729, 2024.

GAU, Tz-Ping *et al.* Application of attenuated total reflection–Fourier transform infrared spectroscopy in semi-quantification of blood lipids and characterization of the metabolic syndrome. **PloS One**, v. 20, n. 1, p. e0316522, 2025.

GIL-GONZALO, Rubén *et al.* Chitosan-coated liposome formulations for encapsulation of ciprofloxacin and etoposide. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 8, p. 1036, 2024.

GOULART, Débora Brito; MELLATA, Melha. *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle: etiology, diagnosis, and treatment challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 928346, 2022.

GRAVÁN, Pablo *et al.* Lipid-core nanoparticles: Classification, preparation methods, routes of administration and recent advances in cancer treatment. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 314, p. 102871, 2023.

HAGNER, K. A. *et al.* Role of mastitis in on-farm deaths of Finnish dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2024.

HARASYM, Joanna; BANAS', Karol. Lecithin's roles in oleogelation. *Gels*, v. 10, n. 3, p. 169, 2024.

HASANKHANI, Aliakbar *et al.* Integrated analysis of inflammatory mRNAs, miRNAs, and lncRNAs elucidates the molecular interactome behind bovine mastitis. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 13826, 2023.

HAXHIAJ, Klevis; WISHART, David S.; AMETAJ, Burim N. Mastitis: What it is, current diagnostics, and the potential of metabolomics to identify new predictive biomarkers. **Dairy**, v. 3, n. 4, p. 722-746, 2022.

HAZRATI, Saeid; MOUSAVI, Zahra; NICOLA, Silvana. Harvest time optimization for medicinal and aromatic plant secondary metabolites. **Plant Physiology and Biochemistry**, p. 108735, 2024.

HOZYEN, H. F. *et al.* Enhanced antibacterial activity of capped zinc oxide nanoparticles: A step towards the control of clinical bovine mastitis. **Veterinary World**, v. 12, n. 8, p. 1225, 2019.

HSU, Chou-Yi *et al.* An overview of nanoparticles in drug delivery: Properties and applications. **South African Journal of Chemical Engineering**, 2023.

HUTIN, Anthony *et al.* Stability of silica nanofluids at high salinity and high temperature. **Powders**, v. 2, n. 1, p. 1-20, 2022.

HWANG, Su-Jeong; LEE, Je-Hyuk. Comparison of antioxidant activities expressed as equivalents of standard antioxidant. **Food Science and Technology**, v. 43, p. e121522, 2023.

IJAZ, Musarrat; AKHTAR, Naveed. Fatty acids based α -Tocopherol loaded nanostructured lipid carrier gel: *In vitro* and *in vivo* evaluation for moisturizing and anti-aging effects. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 19, n. 11, p. 3067-3076, 2020.

ILINA, Tetiana *et al.* Immunomodulatory activity and phytochemical profile of infusions from Cleavers herb. **Molecules**, v. 25, n. 16, p. 3721, 2020.

IQBAL, Dure Najaf *et al.* Fabrication, properties, and stability of oregano essential oil and sodium alginate-based wound-healing hydrogels. **Dose-Response**, v. 21, n. 4, p. 15593258231204186, 2023.

JACOB, Shery *et al.* Innovations in nanoemulsion technology: Enhancing drug delivery for oral, parenteral, and ophthalmic applications. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 10, p. 1333, 2024.

JOHN, Rijo *et al.* Chemistry and art of developing lipid nanoparticles for biologics delivery: focus on development and scale-up. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 1, p. 131, 2024.

JOMOVA, Klaudia *et al.* Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: Chronic diseases and aging. **Archives of Toxicology**, v. 97, n. 10, p. 2499-2574, 2023.

JOUKHADAR, Radwan *et al.* Functional nanostructured lipid carrier-enriched hydrogels tailored to repair damaged epidermal barrier. **Gels**, v. 10, n. 7, p. 466, 2024.

JYOTI *et al.* Thymol chemistry: A medicinal toolbox. **Current Bioactive Compounds**, v. 15,

n. 5, p. 454-474, 2019.

KALIŃSKA, Aleksandra *et al.* Silver and copper nanoparticles as the new biocidal agents used in pre-and post-milking disinfectants with the addition of cosmetic substrates in dairy cows. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1658, 2023.

KAMEDA, Tsunenori. Molecular structure of crude beeswax studied by solid-state ¹³C NMR. **Journal of Insect Science**, v. 4, n. 29, 2004.

KAMENOVA, Katya *et al.* Hydroxypropyl cellulose hydrogel containing *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* essential-oil-loaded polymeric micelles for enhanced treatment of melanoma. **Gels**, v. 10, n. 10, p. 627, 2024.

KAUR, Rajinder *et al.* Microbial volatile compounds in plant health. **The Chemical Dialogue Between Plants and Beneficial Microorganisms**, Academic Press, cap. 17, p. 221-232. 2023.

KENECHUKWU, Franklin Chimaobi *et al.* Enhanced circulation longevity and pharmacodynamics of metformin from surface-modified nanostructured lipid carriers based on solidified reverse micellar solutions. **Heliyon**, v. 8, n. 3, 2022.

KHAIRNAR, Sakshi V. *et al.* Review on the scale-up methods for the preparation of solid lipid nanoparticles. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 9, p. 1886, 2022.

KHALIFA, Hazim O. *et al.* Veterinary drug residues in the food chain as an emerging public health threat: Sources, analytical methods, health impacts, and preventive measures. **Foods**, v. 13, n. 11, p. 1629, 2024.

KHALIQ, Nisar Ul *et al.* Pluronic F-68 and F-127 based nanomedicines for advancing combination cancer therapy. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 8, p. 2102, 2023.

KHAMENEH, Bahman *et al.* Phytochemicals: a promising weapon in the arsenal against antibiotic-resistant bacteria. **Antibiotics**, v. 10, n. 9, p. 1044, 2021.

KHAN, Iftikhar *et al.* Development and characterization of novel combinations and compositions of nanostructured lipid carrier formulations loaded with trans-resveratrol for pulmonary drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 12, p. 1589, 2024.

KHAN, Shadab; SHARMA, Ajay; JAIN, Vikas. An overview of nanostructured lipid carriers and its application in drug delivery through different routes. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 13, n. 3, p. 446, 2022.

KHAN, Wajid *et al.* Therapeutic potential of natural products and antibiotics against bovine mastitis pathogen of cows and buffaloes. **Veterinární Medicína**, v. 68, n. 7, p. 271, 2023.

KHEZRI, Khadijeh *et al.* A promising and effective platform for delivering hydrophilic depigmenting agents in the treatment of cutaneous hyperpigmentation: Kojic acid nanostructured lipid carrier. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 38-47, 2021.

KING, Ryan J.; SINGH, Pankaj K.; MEHLA, Kamiya. The cholesterol pathway: impact on immunity and cancer. **Trends in Immunology**, v. 43, n. 1, p. 78-92, 2022.

KM, Asha Spandana *et al.* Box-behnken design-based optimization and evaluation of lipid-based nano drug delivery system for brain targeting of bromocriptine. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 6, p. 720, 2024.

KOROLKOVAS, Airidas. Fast X-ray diffraction (XRD) tomography for enhanced identification of materials. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 19097, 2022.

KOSAKOWSKA, Olga *et al.* Antioxidant and antibacterial activity of essential oils and hydroethanolic extracts of Greek oregano (*O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart) and common oregano (*O. vulgare* L. subsp. *vulgare*). **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 988, 2021.

KOWALCZYK, Adam *et al.* Thymol and thyme essential oil—new insights into selected therapeutic applications. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 4125, 2020.

KUBILIENE, Asta *et al.* A comparative evaluation of antioxidant activity of extract and essential oil of *Origanum onites* L. *in vivo*. **Molecules**, v. 28, n. 14, p. 5302, 2023.

KUDŁACIK-KRAMARCZYK, Sonia *et al.* Development and analysis of bilayer foamed oleogels stabilized with ecogel™: Exploring the role of tween 80 in modifying physicochemical properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 23, p. 12632, 2024.

KUPERKAR, Ketan *et al.* Degradable polymeric bio (nano) materials and their biomedical applications: A comprehensive overview and recent updates. **Polymers**, v. 16, n. 2, p. 206, 2024.

LAEIN, Sara Safaeian *et al.* Strategies for further stabilization of lipid-based delivery systems with a focus on solidification by spray-drying. **Trends in Food Science & Technology**, p. 104412, 2024.

LAOSINWATTANA, Chamroon *et al.* Ultrasonic emulsification of *Cananga odorata* nanoemulsion formulation for enhancement of herbicidal potential. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 3263, 2025.

LANGE, Agata *et al.* Silver and copper nanoparticles inhibit biofilm formation by mastitis pathogens. **Animals**, v. 11, n. 7, p. 1884, 2021.

LASKAR, Partha *et al.* Biomolecule-functionalized nanoformulations for prostate cancer theranostics. **Journal of Advanced Research**, v. 51, p. 197-217, 2023.

LEDJANAC, Sava *et al.* The influence of the chemical composition of beeswax foundation sheets on their acceptability by the bee's colony. **Molecules**, v. 29, n. 23, p. 5489, 2024.

LI, Meng *et al.* Pluronic F127 coating performance on PLGA nanoparticles: Enhanced flocculation and instability. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 226, p. 113328, 2023.

LI, Xiaoping *et al.* Alternatives to antibiotics for treatment of mastitis in dairy cows. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, p. 1160350, 2023.

LOBIUC, Andrei *et al.* Future antimicrobials: Natural and functionalized phenolics. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1114, 2023.

LOMBARDO, Domenico; KISELEV, Mikhail A. Methods of liposomes preparation: formation and control factors of versatile nanocarriers for biomedical and nanomedicine application. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 3, p. 543, 2022.

LOPES, Tamiris Silva *et al.* Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 131, p. 186-193, 2020.

LOW, Zhen Li *et al.* Ultrasonic cavitation: An effective cleaner and greener intensification technology in the extraction and surface modification of nanocellulose. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 90, p. 106176, 2022.

LUCHEIS, Simone Baldini *et al.* Milk microbiota of clinical mastitic cows: an etiological approach. **Ciência Rural**, v. 55, n. 02, p. e20230555, 2024.

MACHADO, Gabriela T. Pinheiro *et al.* Protection of bovine mammary epithelial cells by a nanoemulsion of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC and its capacity of permeation through mammary epithelium. **Journal of Dairy Research**, v. 89, n. 1, p. 80-85, 2022.

MACZKA, Wanda *et al.* Carvacrol—a natural phenolic compound with antimicrobial properties. **Antibiotics**, v. 12, n. 5, p. 824, 2023.

MAHER, Claire; HASSAN, Karl A. The Gram-negative permeability barrier: tipping the balance of the in and the out. **Mbio**, v. 14, n. 6, p. e01205-23, 2023.

MALL, Jyotiraditya *et al.* Nanostructured lipid carriers as a drug delivery system: A comprehensive review with therapeutic applications. **Intelligent Pharmacy**, 2024.

MARTINEZ-BORRAJO, Rebeca; DIAZ-RODRIGUEZ, Patricia; LANDIN, Mariana. Engineering mannose-functionalized nanostructured lipid carriers by sequential design using hybrid artificial intelligence tools. **Drug Delivery and Translational Research**, p. 1-12, 2024.

MASYITA, Ayu *et al.* Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. **Food Chemistry: X**, v. 13, p. 100217, 2022.

MEHTA, Meenu *et al.* Lipid-based nanoparticles for drug/gene delivery: An overview of the production techniques and difficulties encountered in their industrial development. **ACS Materials Au**, v. 3, n. 6, p. 600-619, 2023.

MENDONÇA, Jenifer da Silva *et al.* Natural antioxidant evaluation: A review of detection methods. **Molecules**, v. 27, n. 11, p. 3563, 2022.

MILLAO, Sonia *et al.* Enhancing the oxidative stability of beeswax—canola oleogels: effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol on their physical and chemical properties. **Gels**, v. 11, n. 1, p. 43, 2025.

MITTAL, Pooja *et al.* Paclitaxel loaded Capmul MCM and tristearin based nanostructured lipid carriers (NLCs) for glioblastoma treatment: screening of formulation components by quality by design (QbD) approach. **Discover Nano**, v. 19, n. 1, p. 1-28, 2024.

MORALES-UBALDO, Ana Lizet *et al.* Bovine mastitis, a worldwide impact disease: prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. **Veterinary and Animal Science**, p. 100306, 2023.

MOTSOENE, Fezile; ABRAHAMSE, Heidi; KUMAR, Sathish Sundar Dhilip. Multifunctional lipid-based nanoparticles for wound healing and antibacterial applications: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, p. 103002, 2023.

MUKASAFARI, Marie Anne *et al.* Management factors affecting milk yield, composition, and quality on smallholder dairy farms. **Tropical Animal Health and Production**, v. 57, n. 2, p. 1-12, 2025.

MUNTEANU, Irina Georgiana; APETREI, Constantin. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3380, 2021.

MUSIELAK, Ewelina; FELICZAK-GUZIŁ, Agnieszka; NOWAK, Izabela. Optimization of the conditions of solid lipid nanoparticles (SLN) synthesis. **Molecules**, v. 27, n. 7, p. 2202, 2022.

NAHARROS-MOLINERO, Almudena *et al.* Direct and reverse pluronic micelles: Design and characterization of promising drug delivery nanosystems. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, p. 2628, 2022.

NAJMI, Asim *et al.* Modern approaches in the discovery and development of plant-based natural products and their analogues as potential therapeutic agents. **Molecules**, v. 27, n. 2, p. 349, 2022.

NAKHAEI, Pooria *et al.* RETRACTED: Liposomes: Structure, biomedical applications, and stability parameters with emphasis on cholesterol. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 705886, 2021.

NASER, Shaikh Sheeran *et al.* Biophysical translational paradigm of polymeric nanoparticle: Embarked advancement to brain tumor therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 179, p. 117372, 2024.

NASIRIZADEH, Samira; MALAEKEH-NIKOUEI, Bizhan. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers in oral cancer drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, p. 101458, 2020.

NECULAI-VALEANU, Andra-Sabina; ARITON, Adina-Mirela. Udder health monitoring for prevention of bovine mastitis and improvement of milk quality. **Bioengineering**, v. 9, n. 11, p. 608, 2022.

NEMATLAB, Mehran *et al.* Formulation of Cinnamon (*Cinnamomum verum*) oil loaded solid lipid nanoparticles and evaluation of its antibacterial activity against multi-drug resistant

- Escherichia coli*. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 22, n. 1, p. 289, 2022.
- NÉMETH, Zsófia *et al.* Quality by design-driven zeta potential optimisation study of liposomes with charge imparting membrane additives. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 9, p. 1798, 2022.
- NSAIRAT, Hamdi *et al.* Liposomes: Structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*, v. 8, n. 5, 2022.
- NOSRATABADI, Mohsen *et al.* Luliconazole-loaded nanostructured lipid carrier: formulation, characterization, and in vitro antifungal evaluation against a panel of resistant fungal strains. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 30708, 2024.
- ORELLANO, María Soledad *et al.* Chitosan nanoparticles enhance the antibacterial activity of the native polymer against bovine mastitis pathogens. **Carbohydrate Polymers**, v. 213, p. 1-9, 2019.
- PADÍN-GONZÁLEZ, Esperanza *et al.* Understanding the role and impact of poly (ethylene glycol)(PEG) on nanoparticle formulation: Implications for COVID-19 vaccines. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 882363, 2022.
- PANCHAL, Janki *et al.* Understanding mastitis: Microbiome, control strategies, and prevalence—A comprehensive review. **Microbial Pathogenesis**, p. 106533, 2024.
- ROJAS-ARMAS, Juan Pedro *et al.* The essential oil of *Cymbopogon citratus* stapt and carvacrol: An approach of the antitumor effect on 7, 12-dimethylbenz-[alpha]-anthracene (DMBA)-induced breast cancer in female rats. **Molecules**, v. 25, n. 14, 2020.
- PENG, Zhili *et al.* Polyethylene glycol (PEG) derived carbon dots: Preparation and applications. **Applied Materials Today**, v. 20, p. 100677, 2020.
- PETER, Sijongesonke; SOTONDOSHE, Namhla; ADERIBIGBE, Blessing A. Carvacrol and thymol hybrids: Potential anticancer and antibacterial therapeutics. **Molecules**, v. 29, n. 10, p. 2277, 2024.
- PETROVIC, Sanja; BITA, Bogdan; BARBINTA-PATRASCU, Marcela-Elisabeta. Nanoformulations in pharmaceutical and biomedical applications: Green perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 11, p. 5842, 2024.
- PHAM LE KHANH, Ha *et al.* **Polymers** Comparative investigation of cellular effects of polyethylene glycol (PEG) derivatives., v. 14, n. 2, p. 279, 2022.
- PINILLA, Cristian Mauricio Barreto; LOPES, Nathalie Almeida; BRANDELLI, Adriano. Lipid-based nanostructures for the delivery of natural antimicrobials. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3587, 2021.
- PIRES, Henrique Machado *et al.* Antimicrobial activity of essential-oil-based nanostructured lipid carriers against *Campylobacter* spp. isolated from chicken carcasses. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 7, p. 922, 2024.
- PLATI, Fotini; PAPI, Rigini; PARASKEVOPOULOU, Adamantini. Characterization of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L. subsp. hirtum) particles produced by the novel nano spray drying technique. **Foods**, v. 10, n. 12, p. 2923, 2021.

PRATIWI, Rimadani *et al.* Recent advances in the determination of veterinary drug residues in food. **Foods**, v. 12, n. 18, p. 3422, 2023.

PONTES-QUERO, Gloria María *et al.* Oregano essential oil micro-and nanoencapsulation with bioactive properties for biotechnological and biomedical applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 703684, 2021.

PUDŽIUVELYTĖ, Lauryna *et al.* *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyl. extracts from different plant parts: Phenolic composition, antioxidant, and anti-inflammatory activities. **Molecules**. Basel: MDPI, 2020, vol. 25, no. 5, 2020.

PUVAČA, Nikola *et al.* Antimicrobial activity of selected essential oils against selected pathogenic bacteria: *In vitro* study. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 546, 2021.

QUEIROZ, Marjorie de Carvalho Vieira; MUEHLMANN, Luís Alexandre. Characteristics and preparation of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. **Journal of Nanotheranostics**, v. 5, n. 4, p. 188-211, 2024.

QURESHI, Muhammad Imran *et al.* Tioconazole-loaded transethosomal gel using box-behnken design for topical applications: *In vitro*, *in vivo*, and molecular docking approaches. **Gels**, v. 9, n. 9, p. 767, 2023.

RADZIKOWSKI, Daniel *et al.* *In vitro* evaluation of the antimicrobial properties of nanoparticles as new agents used in teat sealants for mastitis prevention in dry cows. **Biomedicines**, v. 11, n. 8, p. 2291, 2023.

RAJ, Sibi *et al.* Specific targeting cancer cells with nanoparticles and drug delivery in cancer therapy. In: **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press, 2021. p. 166-177.

RINKY, Farhana *et al.* Residual antibiotics in milk samples: Assessing the risk and prevalence in Bangladesh. **Heliyon**, v. 11, n. 1, 2025.

RIVERA AGUAYO, Paula *et al.* Antimicrobial and antibiofilm capacity of chitosan nanoparticles against wild type strain of *Pseudomonas* sp. isolated from milk of cows diagnosed with bovine mastitis. **Antibiotics**, v. 9, n. 9, p. 551, 2020.

RODRIGUES DA SILVA, Gustavo Henrique *et al.* Antineoplastics encapsulated in nanostructured lipid carriers. **Molecules**, v. 26, n. 22, p. 6929, 2021.

ROSIK, Natalia *et al.* Enhancing the solubility and dissolution of apigenin: Solid dispersions approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 2, p. 566, 2025.

ROY, Arpita *et al.* Flavonoids a bioactive compound from medicinal plants and its therapeutic applications. **BioMed Research International**, v. 2022, n. 1, p. 5445291, 2022.

SAFFARIAN, Hashem *et al.* Antioxidant and antimicrobial effect of sodium alginate nanoemulsion coating enriched with oregano essential oil (*Origanum vulgare* L.) and *Trachyspermum ammi* oil (*Carum cupticum*) on food pathogenic bacteria. **Food Science & Nutrition**, v. 12, n. 4, p. 2985-2997, 2024.

SAHARKHIZ, Shaghayegh; ZAREPOUR, Atefeh; ZARRABI, Ali. Empowering cancer

therapy: Comparing PEGylated and non-PEGylated niosomes loaded with curcumin and doxorubicin on MCF-7 cell Line. **Bioengineering**, v. 10, n. 10, p. 1159, 2023.

SAKELLARI, Georgia I. *et al.* Formulation design, production and characterisation of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for the encapsulation of a model hydrophobic active. **Food Hydrocolloids for Health**, v. 1, p. 100024, 2021.

SAMBHAKAR, Sharda *et al.* Exploring LIPIDS for their potential to improves bioavailability of lipophilic drugs candidates: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 31, n. 12, p. 101870, 2023.

SANDHYA, Madderla *et al.* Ultrasonication an intensifying tool for preparation of stable nanofluids and study the time influence on distinct properties of graphene nanofluids—A systematic overview. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 73, p. 105479, 2021.

SANTANA, Jorge Ederson Gonçalves *et al.* comparative antibacterial and efflux pump inhibitory activity of isolated nerolidol, farnesol, and α -bisabolol sesquiterpenes and their liposomal nanoformulations. **Molecules**, v. 28, n. 22, p. 7649, 2023.

SANTHANAKRISHNAN, Karthick R.; KOILPILLAI, Jebastin; NARAYANASAMY, Damodharan. PEGylation in pharmaceutical development: current status and emerging trends in macromolecular and immunotherapeutic drugs. **Cureus**, v. 16, n. 8, p. e66669, 2024.

SANTONOCITO, Debora; PUGLIA, Carmelo. Lipid nanoparticles and skin: Discoveries and advances. **Cosmetics**, v. 12, n. 1, p. 22, 2025.

SAOUDI, Bilal *et al.* Enhancing antibiotic efficacy and combating biofilm formation: Evaluating the synergistic potential of *Origanum vulgare* essential oil against multidrug-resistant gram-negative bacteria. **Microorganisms**, v. 12, n. 8, p. 1651, 2024.

SERNA-GALLÉN, Pablo; MUŽINA, Katarina. Metallic nanoparticles at the forefront of research: Novel trends in catalysis and plasmonics. **Nano Materials Science**, 2024.

SHANG, Qi *et al.* Nano-formulated delivery of active ingredients from traditional Chinese herbal medicines for cancer immunotherapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 14, n. 4, p. 1525-1541, 2024.

SHARBATDARAN, Masoomah; SHAHBAZI, Samira. Metabolomics reveals discrimination of iranian propolis using LC-MS and NMR analysis. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE) Research Article** Vol, v. 43, n. 10, 2024.

SHARMA, Shubham *et al.* Encapsulation of essential oils in nanocarriers for active food packaging. **Foods**, v. 11, n. 15, p. 2337, 2022.

SHARMEEN, Jugreet B. *et al.* Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 666, 2021.

SHEN, Lipeng *et al.* A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies. **Ultrasonics Sonochemistry**, p. 106646, 2023.

SHI, Shaoyan; DUAN, Honghao; OU, Xuehai. Targeted delivery of anti-osteoporosis therapy: Bisphosphonate-modified nanosystems and composites. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 175, p. 116699, 2024.

SIDIROPOULOU, Erasmia *et al.* *In vitro* antioxidant, antimicrobial, anticoccidial, and anti-inflammatory study of essential oils of oregano, thyme, and sage from Epirus, Greece. **Life**, v. 12, n. 11, p. 1783, 2022.

SILHAVY, Thomas J.; KAHNE, Daniel; WALKER, Suzanne. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 5, p. a000414, 2010.

SILVA, Debora F. *et al.* Biomedical approach of nanotechnology and biological risks: A mini-review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 23, p. 16719, 2023.

SILVA, Elenice Francisco da *et al.*, Lipid nanoparticles carrying essential oils for multiple applications as antimicrobials. **Pharmaceutics**, v. 17, n. 2, p. 178, 2025.

SONAR, Eshwari *et al.* Nanoparticles of chitosan and oregano essential oil: application as edible coatings on chicken patties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 60, n. 11, p. 2868-2880, 2023.

SONG, Ruiteng; LIN, Yongqi; LI, Zhenzhen. Ultrasonic-assisted preparation of eucalyptus oil nanoemulsion: Process optimization, *in vitro* digestive stability, and anti-*Escherichia coli* activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 82, p. 105904, 2022.

SOUTELINO, Maria Eduarda Marques; SILVA, Adriana Cristina de Oliveira; ROCHA, Ramon da Silva. Natural antimicrobials in dairy products: Benefits, challenges, and future trends. **Antibiotics**, v. 13, n. 5, p. 415, 2024.

SOUTO, Carlos Augusto Zanoni *et al.* Magnetite nanoparticles encapsulated with PBS-PEG for AMF hyperthermia. **Materials**, v. 18, n. 2, p. 258, 2025.

SUBHAWA, Subhawati; CHEWONARIN, Teera; BANJERDPONGCHAI, Ratana. The effects of *Houttuynia cordata* Thunb and piper ribesoides wall extracts on breast carcinoma cell proliferation, migration, invasion and apoptosis. **Molecules**, v. 25, n. 5, p. 1196, 2020.

SYED AZHAR, Sharifah Nurfadhlin Afifah *et al.* Nanostructured lipid carriers-hydrogels system for drug delivery: Nanohybrid technology perspective. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 289, 2022.

TAKEGAWA, Ryosuke *et al.* The role of homogenization cycles and Poloxamer 188 on the quality of mitochondria isolated for use in mitochondrial transplantation therapy. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 3350, 2025.

TANG, Chuan-He; CHEN, Huan-Le; DONG, Jin-Ru. Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs) as food-grade nanovehicles for hydrophobic nutraceuticals or bioactives. **Applied Sciences**, v. 13, n. 3, p. 1726, 2023.

TEJADA-MUÑOZ, Sonia *et al.* Antimicrobial activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Pharmaceutics**, v. 17, n. 11, p. 1430, 2024.

THUY, Vy Nguyen *et al.* Nanostructured lipid carriers and their potential applications for versatile drug delivery via oral administration. **OpenNano**, v. 8, p. 100064, 2022.

TIAN, Ming *et al.* Untargeted metabolomics reveals predominant alterations in primary metabolites of broccoli sprouts in response to pre-harvest selenium treatment. **Food Research International**, v. 111, p. 205-211, 2018.

TOMNIKOVA, Alice; ORGONIKOVA, Andrea; KRIZEK, Tomas. Liposomes: preparation and characterization with a special focus on the application of capillary electrophoresis. **Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly**, v. 153, n. 9, p. 687-695, 2022.

TOMIĆ, Ana; ŠOVLJANSKI, Olja; ERCEG, Tamara. Insight on incorporation of essential oils as antimicrobial substances in biopolymer-based active packaging. **Antibiotics**, v. 12, n. 9, p. 1473, 2023.

TONG, Xiaofang *et al.* Virulence of bacteria causing mastitis in dairy cows: A Literature review. **Microorganisms**, v. 13, n. 1, p. 167, 2025.

TREIBER, Fritz Michael; BERANEK-KNAUER, Heide. Antimicrobial residues in food from animal origin—A review of the literature focusing on products collected in stores and markets worldwide. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 534, 2021.

UCHÔA, Ana Flávia Chaves *et al.* Optimization and functionalization of copaiba oil-loaded nanostructured lipid carriers to improve cytotoxicity against breast cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 106575, 2025.

UNNISA, Aziz *et al.* Nanostructured lipid carriers to enhance the bioavailability and solubility of ranolazine: Statistical optimization and pharmacological evaluations. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 8, p. 1151, 2023.

UPADHYAY, Kanchan *et al.* Surface functionalized nanoparticles: a boon to biomedical science. **Chemico-Biological Interactions**, v. 380, p. 110537, 2023.

UTTERSTRÖM, Johanna *et al.* Peptide-folding triggered phase separation and lipid membrane destabilization in cholesterol-rich lipid vesicles. **Bioconjugate Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 736-746, 2022.

VERRILLO, Mariavittoria *et al.* Valorization of organic biomass through the production of active biopolymer film based on sodium caseinate, guar gum, and beeswax. **Food Bioscience**, v. 53, p. 102757, 2023.

VIEGAS, Cláudia *et al.* Solid lipid nanoparticles vs. nanostructured lipid carriers: a comparative review. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 6, p. 1593, 2023.

WALASEK-JANUSZ, Magdalena *et al.* Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activity of oregano essential oil. **Molecules**, v. 29, n. 2, p. 435, 2024.

WANG, Bilan *et al.* Current advance of nanotechnology in diagnosis and treatment for malignant tumors. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, p. 200, 2024.

WANG, Man; YU, Fei; ZHANG, Yuan. Present and future of cancer nano-immunotherapy:

opportunities, obstacles and challenges. **Molecular Cancer**, v. 24, n. 1, p. 26, 2025.

WANG, Yue *et al.* Nutrition, gastrointestinal microorganisms and metabolites in mastitis occurrence and control. **Animal Nutrition**, 2024.

WATHONI, Nasrul *et al.* Advancements and challenges of nanostructured lipid carriers for wound healing applications. **International Journal of Nanomedicine**, p. 8091-8113, 2024.

WESOŁOWSKI, Marek; LEYK, Edyta. Coupled and simultaneous thermal analysis techniques in the study of pharmaceuticals. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 6, p. 1596, 2023.

WIŚNIEWSKI, Patryk *et al.* Antimicrobial resistance in the context of animal production and meat products in Poland—A critical review and future perspective. **Pathogens**, v. 13, n. 12, p. 1123, 2024.

WU, Yue *et al.* Innovative nanotechnology in drug delivery systems for advanced treatment of posterior segment ocular diseases. **Advanced Science**, p. 2403399, 2024.

XU, Li *et al.* Role of LsrR in the regulation of biofilm formation in mammary pathogenic *Escherichia coli*. **BMC Veterinary Research**, v. 20, n. 1, p. 220, 2024.

YADAV, Preeti *et al.* Bioengineered ciprofloxacin-loaded chitosan nanoparticles for the treatment of bovine mastitis. **Biomedicines**, v. 10, n. 12, p. 3282, 2022.

YANAR, Fatih; CARUGO, Dario; ZHANG, Xunli. Hybrid nanoplatfroms comprising organic nanocompartments encapsulating inorganic nanoparticles for enhanced drug delivery and bioimaging applications. **Molecules**, v. 28, n. 15, p. 5694, 2023.

YANG, Lisha; WEN, Jia. Can DLVO theory be applied to MOF in different dielectric solvents?. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 343, p. 112166, 2022.

YONCHEVA, Krassimira *et al.* Improvement of the antimicrobial activity of oregano oil by encapsulation in chitosan—Alginate nanoparticles. **Molecules**, v. 26, n. 22, p. 7017, 2021.

YU, Yi-Qun *et al.* Enhancing permeation of drug molecules across the skin via delivery in nanocarriers: novel strategies for effective transdermal applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 646554, 2021.

YUAN, Ming *et al.* Dipeptide-1 modified nanostructured lipid carrier-based hydrogel with enhanced skin retention and topical efficacy of curcumin. **RSC Advances**, v. 13, n. 42, p. 29152-29162, 2023.

YUSUF, Azeez *et al.* Nanoparticles as drug delivery systems: a review of the implication of nanoparticles' physicochemical properties on responses in biological systems. **Polymers**, v. 15, n. 7, p. 1596, 2023.

ZABOT, Giovani Leone; VIGANÓ, Juliane; SILVA, Eric Keven. Low-frequency ultrasound coupled with high-pressure technologies: Impact of hybridized techniques on the recovery of phytochemical compounds. **Molecules**, v. 26, n. 17, p. 5117, 2021.

ZHANG, Ting *et al.* Double-layered microcapsules significantly improve the long-term

effectiveness of essential oil. **Polymers**, v. 12, n. 8, p. 1651, 2020.

ZHANG, Zhe *et al.* Detection of antibiotic resistance, virulence gene, and drug resistance gene of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 4, p. e00471-22, 2022.

ZHAO, Fujunzhu; WANG, Zhiwu; HUANG, Haibo. Physical cell disruption technologies for intracellular compound extraction from microorganisms. **Processes**, v. 12, n. 10, p. 2059, 2024.

ZHENG, Haoxuan; ZHENG, Ying; ZHU, Jesse. Recent developments in hydrodynamic cavitation reactors: Cavitation mechanism, reactor design, and applications. **Engineering**, v. 19, p. 180-198, 2022.

ZHU, Jiajun *et al.* Harnessing nanotechnology for cancer treatment. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 12, p. 1514890, 2025.

ZHU, Xianglu *et al.* Acoustic cavitation for agri-food applications: Mechanism of action, design of new systems, challenges and strategies for scale-up. **Ultrasonics Sonochemistry**, p. 106850, 2024.

ZHUO, Yue; ZHAO, Yong-Gang; ZHANG, Yun. Enhancing drug solubility, bioavailability, and targeted therapeutic applications through magnetic nanoparticles. **Molecules**, v. 29, n. 20, p. 4854, 2024.