

Eng^a. Agr^a. Gabriela Tasso Bongioiolo Pinheiro Machado

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO *in vitro* DAS ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE NANOPARTÍCULAS DE
PRÓPOLIS PARA POTENCIAL USO INTRAMAMÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agroecossistemas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito a obtenção do Grau de Mestre em Agroecossistemas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Shirley Kuhnen

Co-orientadora: Dr.^a Maria Beatriz da R. Veleirinho

**Florianópolis
2017**

MACHADO, Gabriela Tasso Bongiolo Pinheiro

Desenvolvimento e avaliação *in vitro* das atividades antimicrobiana e citotóxica de nanopartículas de própolis para potencial uso intramamário

80 p.

Orientadora: Shirley Kuhnen

Co- orientadora: Maria Beatriz da Rocha Veleirinho

Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Santa Catarina,

Centro de Ciências Agrárias.

Inclui referências

1. Agroecossistemas 2. Sanidade Animal 3. Nanotecnologia 4. Produtos naturais

I. Kuhnen, Shirley. II. Veleirinho, Maria Beatriz da Rocha. III. Universidade Federal de Santa Catarina, Agroecossistemas. IV. Título.

AGRADECIMENTO

Agradecer é a arte de atrair coisas boas!

Segue aqui um agradecimento sincero à minha família e a todos os amigos que comigo compartilharam dessa conquista.

RESUMO

A mastite bovina representa um importante entrave na cadeia produtiva do leite que afeta tanto a qualidade como a quantidade de leite produzido, acarretando em importantes prejuízos econômicos. Na maioria das vezes, a mastite é causada por bactérias, com destaque para *Staphylococcus aureus*. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento de nanopartículas de própolis e a avaliação *in vitro* do seu potencial para o tratamento da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. O estudo compreendeu o desenvolvimento de três suspensões de nanopartículas de própolis (NP-1, NP-2 e NP-3), variando a proporção de surfactantes na sua composição, por meio da técnica de difusão do solvente a quente. As nanopartículas de própolis foram avaliadas quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, morfologia e quanto à estabilidade ao longo de 150 dias. O teor de fenólicos totais e a eficiência de encapsulação também foram avaliados. A atividade antimicrobiana das nanopartículas de própolis foi determinada *in vitro* pela técnica de microdiluição em caldo. A citotoxicidade das nanopartículas em células da glândula mamária bovina da linhagem MAC-T foi determinada pelo método do Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil (MTT). As nanopartículas mantiveram-se estáveis durante todo o período avaliado. Todas apresentaram formato esférico, pH entre 3,9 e 4,2 e distribuição monodispersa ($PDI < 0,2$). O tamanho médio de partícula foi de 194,2, 181,2 e 201,0 nm, respectivamente, para as nanopartículas NP-1, NP-2 e NP-3. O teor de fenólicos totais variou de 145 a 167 μg equivalentes de ácido gálico/mg e a eficiência de encapsulação foi de 73% (NP-1), 88% (NP-2) e 91% (NP-3). As suspensões de nanopartículas de própolis apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, com valores de concentração inibitória mínima (MIC) de 156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para as nanopartículas NP-1 e NP-3 e 310 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a nanopartícula NP-2. No estudo de citotoxicidade *in vitro*, os valores de concentração inibitória 50% (IC_{50}) das suspensões foram 159,1, 122,2 e 159,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para as nanopartículas NP-1, NP-2 e NP3, respectivamente. Com isso, o presente trabalho mostrou que a própolis nanoestruturada representa

uma alternativa promissora para a obtenção de sistemas naturais contendo altas concentrações de extrato em meio aquoso, estáveis por considerável período de tempo. Entretanto, a composição das formulações de nanopartículas pode resultar em características físico-químicas e respostas biológicas diferentes. A atividade antimicrobiana apresentada pelas nanopartículas veio acompanhada de efeitos citotóxicos, influenciados pela concentração e pela formulação, sugerindo cautela no seu uso e aplicação na terapêutica da mastite bovina.

Palavras-chave: própolis, nanotecnologia, *Staphylococcus aureus*, MIC , MAC-T, leite orgânico.

ABSTRACT

Bovine mastitis remains an important obstacle to the milk production chain that affects both the quality and the quantity of milk produced, leading to significant economic losses. Mostly, mastitis is caused by bacteria, especially *Staphylococcus aureus*. Thus, the objective of the present study was the development of propolis nanoparticles and the in vitro evaluation of their potential for the treatment of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. The study comprised the development of three suspensions of propolis nanoparticles (NP-1, NP-2 and NP-3), varying the proportion of surfactants in their composition, through the hot solvent diffusion technique. Propolis nanoparticles were evaluated for particle size, polydispersity index, zeta potential, pH, morphology and stability over 150 days. Total phenolic content and encapsulation efficiency were also evaluated. The antimicrobial activity of propolis nanoparticles was determined, in vitro, by the broth microdilution technique. The cytotoxicity of the nanoparticles to MAC-T bovine mammary epithelial cells was determined by the MTT method (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolyl bromide). The nanoparticles remained stable throughout the period evaluated. All presented spherical shape, pH between 3.9 and 4.2 and monodisperse distribution (PDI <0.2). The mean particle size was 194.2, 181.2 and 201.0 nm, respectively, for the NP-1, NP-2 and NP-3 nanoparticles. The total phenolic content ranged from 145 to 167 µg gallic acid equivalent / mg and the encapsulation efficiency was 73% (NP-1), 88% (NP-2) and 91% (NP-3). Suspensions of propolis nanoparticles showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, with minimum inhibitory concentration (MIC) of 156 µg / mL for NP-1 and NP-3 nanoparticles and 310 µg / mL for NP-2 nanoparticle. In the in vitro cytotoxicity study, the 50% inhibitory concentration values (IC50) of the suspensions were 159.1, 122.2 and 159.1 µg / mL for NP-1, NP-2 and NP3 nanoparticles, respectively. With this, the present work showed that nanostructured propolis represents a promising alternative for the obtaining of natural systems containing high concentrations of extract in aqueous medium, stable for a considerable period of time. However,

the composition of the nanoparticle formulations may result in different physicochemical characteristics and biological responses. The antimicrobial activity presented by the nanoparticles was accompanied by cytotoxic effects, influenced by the concentration and the formulation, suggesting caution in its use and application in the treatment of bovine mastitis.

Keywords: propolis, nanotechnology, *Staphylococcus aureus*, MIC, MAC-T, organic milk.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1: Amostras de própolis bruta de diferentes origens: (A) São Joaquim, (B) Água Doce, (C) Urupema, (D) Minas Gerais. Fonte: Fiordalisi et al., 2016.....26

Figura 2: Escala de tamanho de nanomateriais em comparação com vários componentes biológicos. Fonte: Irache et al., 2011.....29

Publicação: Development of propolis nanoparticles for the treatment of bovine mastitis and in vitro evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities

Figure 1: Propolis nanoparticle suspension.....43

Figure 2: Size distribution by intensity of NP-1, NP-2 E NP-3 propolis nanoparticles.....44

Figure 3: Transmission electron microscopy of nanoparticles NP-1 (A), NP-2 (B), and NP-3 (C).....45

Figure 4: Transmission electron microscope of nanoparticles NP-1 (A), NP-2 (B), and NP-3 (C) after 150 days of stability testing.....47

Figure 5: Image of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the nanoparticle suspensions NP-1 and NP-3 (A) and the MIC of NP-2 (B) after the addition of resazurin.....50

Figure 6: MAC-T cellular viability. Results expressed as percentage of viable cells \pm standard deviation. Different uppercase letters represent significant differences between nanoparticles NP-1, NP-2, NP-3 and the

extract. Different lowercase letters represent significant differences among concentrations (Tukey, $P < 0.05$).....53

Supplementary Material

Figure S1. Antimicrobial activity of propolis nanoparticles NP-1, NP-2, NP-3 and propolis extract against *S. aureus* ATCC 25923 and 7 different isolates of mastitic milk.....62

Figure S2. Cytotoxicity in MAC-T cell lines after exposure to different concentrations of propolis nanoparticles (A:NP-1, B:NP-2 and C:NP-3) represented by ■ and their respective blank-nanoparticles represented by •. Results expressed as mean percentage of viable cells and standard deviation.....63

Figure S3. Cytotoxicity in MAC-T cell lines after exposure to different concentrations of propolis extract and nanoparticles NP-1, NP-2, NP-3 and their blank-nanoparticles. Results expressed as mean percentage of viable cells and standard deviation.....64

LISTA DE TABELAS

Publicação: Development of propolis nanoparticles for the treatment of bovine mastitis and in vitro evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities

Table 1: Composition of the developed suspensions of propolis nanoparticles (NP).....	38
Table 2: Antimicrobial resistance* of seven isolates of mastitic milk from Brazilian dairy herds.....	40
Table 3: Physico-chemical characteristics of the developed propolis nanoparticles.....	43
Table 4: Total phenolics and encapsulation efficiency of the developed propolis nanoparticles.....	46
Table 5: Average size, PDI, zeta potential, and pH of nanoparticles NP-1, NP-2, and NP-3 over 150 days of storage at room temperature.....	48
Table 6: Reduction in bacterial activity for nanoparticle suspensions NP-1, NP-2, and NP-3 and propolis extract.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC- American Type Culture Collection (Coleção Americana de Tipos de Culturas)
BHI- Brain Heart Infusion (Infusão de cérebro e coração)
CBT- Contagem Bacteriana Total
CCS- Contagem de Células Somáticas
CIM- Concentração inibitória mínima
CMT- California Mastitis Test (Teste Califórnia para Mastites)
DMSO- Dimetilsulfóxido
FAASC- Federação das Associações de Apicultores de Santa Catarina
IC₅₀- Concentração Inibitória de 50%
MIC- Concentração Inibitória Mínima
IN- Instrução Normativa
LMBV- Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal
MAC-T- Mammary Alveolar Cell-T (Células Alveolares Mamárias T)
MIC- Concentração inibitória mínima
MTT- Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil
SC- Santa Catarina
TVS- Terapia da Vaca Seca
UFC- Unidades Formadoras de Colônia
UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	13
OBJETIVOS.....	17
Objetivo Geral.....	17
Objetivos específicos.....	17
Hipóteses.....	18
REVISÃO DE LITERATURA.....	19
1. Mastite.....	20
1.1 Terapia antimicrobiana.....	21
1.2 Própolis.....	25
1.3 Nanotecnologia.....	28
2. Nanopartículas de própolis.....	31
Publicação: <i>Development of propolis nanoparticles for the treatment of bovine mastitis and in vitro evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities</i>	32
Discussão geral.....	65
Conclusão.....	68
Referências.....	70
Material suplementar.....	78

INTRODUÇÃO GERAL

O presente trabalho está inserido na linha de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Morfofisiologia animal da UFSC sobre produtos naturais como alternativa no controle da mastite bovina. A equipe do laboratório vem trabalhando o tema desde 2012, com ênfase na investigação do uso de extratos e nano-derivados obtidos de produtos naturais com reconhecida ação antimicrobiana, anti-inflamatória e/ou cicatrizante.

O aumento da demanda por alimentos e produtos agropecuários com alta qualidade biológica e benéficos à saúde, ao ambiente e ao bem-estar implica em encontrar soluções e inovações para a agricultura. Destaca-se, neste contexto, o aumento da procura por produtos orgânicos e agroecológicos como o leite. O leite é um alimento de altíssimo valor nutricional e popularmente consumido desde os primeiros anos de vida do ser humano. É utilizado também na fabricação de diversos derivados, como queijos, manteiga, iogurtes, os quais são amplamente consumidos, tornando constante a preocupação da população em relação à contaminação microbiológica e à qualidade deste alimento. A qualidade do leite produzido depende de diversos fatores, dentre eles a ausência de agentes patogênicos e resíduos antimicrobianos. A preservação das características e da composição do leite promove segurança alimentar e nutricional. Direcionar o sistema produtivo de leite para a agroecologia, a qual preconiza a produção de alimentos com qualidade biológica superior, é um desafio que requer estudos e pesquisas capazes de proporcionar soluções aos entraves da cadeia produtiva, como o manejo sanitário.

Dentre os mais importantes problemas sanitários da produção de leite estão os casos de mastite, enfermidade que costumeiramente leva à utilização de medicamentos com ação antimicrobiana (IFAH-Europa). A mastite ainda está presente em muitas propriedades leiteiras e causa importantes prejuízos à atividade (Erskine et al., 2003). No Brasil, as estimativas do impacto econômico real da mastite em uma propriedade leiteira, com aproximadamente 140 cabeças, são de até US \$ 61.623,13 por ano, relacionados principalmente à redução da produção de leite (77,7%) e ao descarte do mesmo (14,0%) (Guimarães

et al., 2017). A doença consiste em um processo inflamatório da glândula mamária, causada predominantemente por bactérias, afetando a produtividade, o bem-estar animal e a qualidade do leite. As bactérias do gênero *Staphylococcus* sp. são consideradas microrganismos de grande importância na incidência de mastite infecciosa nos rebanhos leiteiros com relevância direta para a saúde humana (IFAH-Europa, 2013), sendo ainda capazes de apresentar elevada resistência aos antimicrobianos comercializados (Erskine et al., 2003; Vintov et al., 2003; Feng et al., 2016). No Brasil, importante país produtor de leite, os testes de antibiograma apontaram uma grande variação de susceptibilidade das cepas de *S. aureus* aos antimicrobianos testados, com a ocorrência de 54 padrões de resistência diferentes (Costa et al., 2012).

Dentre os parâmetros utilizados como critério de diagnóstico indireto de mastite está a contagem de células somáticas (CCS). Isto porque, a existência de infecção e o estabelecimento de um processo inflamatório na glândula mamária aumentam a CCS no leite. As mudanças mais importantes no leite, devido aos casos de mastite, incluem descoloração, presença de coágulos e presença de um elevado número de leucócitos (Radostits et al., 2007). Estabelecer parâmetros de qualidade para o leite produzido é um importante instrumento para se conhecer e monitorar o produto que sai das propriedades rurais que praticam a atividade leiteira. Nesse contexto, a legislação brasileira através da Instrução Normativa 62 (IN62) vem definindo novos valores máximos permitidos de CCS e CBT no leite (Brasil, 2011). Entretanto, nem sempre é fácil para os agricultores se adequarem aos padrões vigentes estabelecidos. Na prática, as metas de redução dos valores de CCS e CBT propostas pela IN 62, podem induzir ao uso indiscriminado de medicamentos antimicrobianos convencionais, que podem ser facilmente adquiridos no comércio local. Além de poder contribuir com o desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes e com o aumento de resíduos antimicrobianos no leite, já que muitas indústrias adotam tabelas de pagamento que bonificam ou penalizam produtores de acordo com a qualidade do leite produzido. De fato, muitos estabelecimentos leiteiros ainda estão produzindo leite fora do padrão

de qualidade que vem sendo estabelecido pela IN62 (Langoni et al., 2009; Kuhnen et al., 2015; Balcão et al., 2016).

Diante do exposto, busca-se através da utilização dos produtos naturais, novas opções de tratamentos para a mastite bovina. Entretanto, a falta de dados e de estudos que comprovem a eficácia dos produtos naturais na terapêutica da doença torna-se um entrave para o desenvolvimento de novas soluções e recomendações. Nesse sentido, considerando que a própolis é reconhecida por exercer diversas atividades biológicas, tais como antimicrobiana e anti-inflamatória, esta se constitui em um produto em potencial para o tratamento da mastite bovina. A aplicação de tratamentos à base de própolis pode permitir a redução do uso de antimicrobianos e contribuir para a qualidade do leite produzido. Nos últimos anos, estudos da utilização da própolis na medicina natural e na medicina veterinária vêm aumentando consideravelmente, destacando importantes achados (Langoni et al., 1996; Pinto et al., 2001; Loguercio et al., 2006; Neto et al., 2009; Saeki et al., 2011; Santana et al., 2012; Troncarelli et al., 2013; Fiordalisi et al., 2016).

No entanto, apesar do comprovado potencial da própolis como agente antimicrobiano e anti-inflamatório, a sua aplicação intramamária no contexto da terapêutica da mastite bovina é limitada pela baixa solubilidade em água. Desse modo, estudos de aplicação da nanotecnologia relacionada à própolis vêm sendo propostos para o desenvolvimento de suspensões de própolis nanoparticulada, com o objetivo de aumentar a solubilidade, a estabilidade e a efetividade dos compostos ativos. Nesse contexto, já existe evidência do uso de nanoformulações de própolis para o controle de organismos multirresistentes de difícil eliminação por tratamentos convencionais (Troncarelli et al., 2013).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de formulações de nanopartículas de própolis estáveis em sistema aquoso, com elevada eficiência de encapsulação,

associada à elevada atividade biológica. As nanopartículas de própolis produzidas com extrato oriundo do município de Urupema – SC foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* causadores de mastite e quanto à citotoxicidade sobre células epiteliais mamárias bovinas da linhagem MAC-T, visando o desenvolvimento de um produto de uso intramamário para o controle da mastite bovina.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver nanopartículas de própolis estáveis em sistemas aquosos e avaliar *in vitro* o seu potencial antimicrobiano e citotóxico visando o seu uso no controle da mastite bovina.

Objetivos específicos

- Desenvolvimento de três formulações de nanopartículas de própolis utilizando a técnica de difusão do solvente a quente;
- Caracterização das formulações quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, morfologia, concentração de própolis e eficiência de encapsulação;
- Avaliação da estabilidade das formulações de nanopartículas, armazenadas em temperatura ambiente, quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e morfologia.

- Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* das diferentes formulações sobre a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e isolados de leite mastítico;
- Avaliação da citotoxicidade *in vitro* das diferentes formulações sobre células epiteliais mamárias bovina da linhagem (MAC-T).

HIPÓTESES

- ✓ As nanopartículas de própolis desenvolvidas pela técnica de difusão do solvente a quente apresentarão características físico-químicas propícias para o tratamento da mastite bovina.
- ✓ As nanopartículas de própolis desenvolvidas reduzirão o crescimento de *Staphylococcus aureus* e apresentarão baixa toxicidade às células da linhagem MAC-T, podendo ser indicadas para o controle e tratamento da mastite bovina causada por *S. aureus*.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Mastite

A mastite é considerada a principal e mais freqüente doença que acomete os rebanhos leiteiros. Consiste no processo inflamatório da glândula mamária e é responsável por perdas produtivas e econômicas significativas (Gruet et al., 2001; Erskine et al., 2003; Guimarães et al., 2017). A mastite classifica-se em subclínica e clínica, sendo a maioria das infecções diagnosticadas na forma subclínica. Segundo Radostits et al. (2007), estima-se que a perda de leite em quartos afetados por mastite subclínica varie de 10% a 26%. A mastite subclínica é uma doença silenciosa caracterizada pela diminuição da produção leiteira e sintomatologia menos evidente quando comparada à mastite clínica. Já a mastite clínica pode afetar o leite, o úbere e o animal visivelmente, facilitando o seu diagnóstico. Radostits et al. (2007), descreveram o desenvolvimento da mastite como um processo complexo que envolve três estágios: invasão, infecção e inflamação. Invasão é o estágio no qual o patógeno se move da extremidade do teto para o leite, no interior do canal do teto. Infecção é o estágio em que os patógenos se multiplicam rapidamente e invadem o tecido da glândula mamária. A inflamação segue a infecção, e representa o estágio em que a mastite clínica ocorre com diferentes graus de efeitos clínicos e com diversos efeitos sistêmicos, como aumento de temperatura, inchaço acentuado, gangrena e abscessos. Dessa forma, a glândula mamária é um exemplo de tecido onde a resposta inflamatória é geralmente prejudicial à função do mesmo (Cunningham & Klein, 2008). Logo, as abordagens terapêuticas de controle da mastite devem combinar agentes anti-inflamatórios e antimicrobianos.

Um manejo terapêutico eficiente envolve a correta seleção de um antimicrobiano, bem como a duração do tratamento, para que se evite o aparecimento de resistência microbiana. No entanto, o fato de se usar agentes antimicrobianos extensiva e indiscriminadamente para tratamento da mastite resulta em cepas cada vez mais resistentes, tornando-se o maior obstáculo para a eficácia dos tratamentos (Vintov et al., 2003; Oliveira et al., 2012; Oliver et al., 2012). De fato, a avaliação da resistência de *S. aureus* isolados de mastite a

antimicrobianos, mostrou que o maior índice de resistência foi observado para polimixina B (82%), seguido pelos betalactâmicos, ampicilina e penicilina, com índices de resistência de 80,92 e 80,45%, respectivamente (Costa et al., 2012). Da mesma forma, em uma avaliação conduzida com 815 isolados de *S. aureus* de mastite bovina, a resistência à penicilina foi encontrada entre as cepas de todos os países avaliados, com uma ocorrência média de 32,4% (Vintov et al., 2003). Em todos os países também se observou resistência à estreptomicina e à tetraciclina. Similarmente, Feng et al. (2016), classificaram os isolados de *S. aureus* como multirresistentes devido a alta taxa de resistência microbiana encontrada para diversos grupos químicos comumente utilizados no controle da mastite bovina, especialmente à penicilina. Os autores observaram também alta resistência genética e fenotípica microbiana em isolados. Cabe destacar que no Brasil não existe nenhum controle eficaz na venda de medicamentos veterinários. A mastite é, portanto, na maioria das vezes tratada pelos próprios agricultores, sem orientação profissional, o que colabora para o incremento da resistência aos antimicrobianos e para a ocorrência de resíduos destes no leite e derivados.

1.1 Terapia antimicrobiana

A terapia antimicrobiana baseia-se em alguns princípios: identificação e caracterização dos patógenos; seleção do princípio ativo; obtenção de concentrações efetivas do agente antimicrobiano; seleção de uma frequência e de uma proporção de dosagem; seleção da via de administração, bem como a duração da terapia. A metodologia, as cepas, os meios, a velocidade de difusão do ativo, o tempo, as concentrações bactericidas e a concentração de inibição bacteriana constituem pontos importantes. Para a correta seleção de um antimicrobiano, avaliações *in vitro* podem ser realizadas. Os resultados *in vitro* da susceptibilidade de uma bactéria aos antimicrobianos são expressos em resultados qualitativos que apontam

se a bactéria é susceptível, intermediária ou resistente ao antimicrobiano, e quantitativos onde determina-se os valores da concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL (Spinosa et al., 2011).

O manejo terapêutico da mastite bovina pode basear-se na administração de formulações de liberação imediata durante a lactação ou em formulações de ação prolongada durante o período seco. Cabe destacar que o tratamento de mastite subclínica durante a lactação é comumente considerado inviável devido aos custos elevados com diagnóstico, medicamentos, descarte de leite e baixa taxa de cura bacteriológica principalmente em casos de infecções por estafilococos. Nessa perspectiva, destaca-se que vários agentes antimicrobianos perdem muito da sua atividade quando o leite é incorporado ao meio usado no teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (Quinn et al., 2005). Contudo, existe a chamada blitzterapia, manejo adotado por alguns países, que consiste em mapear todos os casos de mastite da propriedade, seguido do tratamento das vacas com mastite subclínica em lactação. Essa alternativa de manejo mostrou ser economicamente viável, apresentando relação custo/benefício favorável em propriedades onde a perda de leite na produção e no laticínio era alta devido à prevalência da doença (Radostits et al., 2007). Por outro lado, o tratamento de casos subclínicos causados por *S. aureus* durante a lactação conseguiram cura bacteriológica em somente 40% dos casos, devido, principalmente, ao fato de *S. aureus* conseguir sobreviver dentro das células e a maioria dos antimicrobianos ser incapaz de penetrá-las (Blowey & Edmondson., 1999). Nesse contexto, *S. aureus* são ainda capazes de formar abscessos impedindo o sucesso de terapias antimicrobianas por via intramamária (Erskine et al., 2003; Gruet et al., 2001). Dessa forma, *S. aureus* segue sendo um dos principais problemas na mastite bovina, ainda presente fortemente nas propriedades leiteiras brasileiras. Fato relacionado principalmente à baixa taxa de cura, apesar da susceptibilidade *in vitro* das bactérias (Gruet et al., 2001). Uma razão provável para isso é a sua localização intracelular, *i.e.* dentro dos fagócitos do úbere (Gruet et al., 2001). Nesse contexto, Hébert et al. (2000), destacaram que *S. aureus* são capazes de penetrar e sobreviver nas células alveolares e nos

macrófagos isolados de amostras de leite coletadas de bovinos com mastite crônica, sem, entretanto, manter necessariamente uma infecção ativa. Os resultados deste trabalho mostraram a presença de DNA de *Staphylococcus* dentro de ambos os tipos celulares, embora em maior porcentagem no interior dos macrófagos. *S. aureus* é ainda capaz de se multiplicar depois de penetrar nas células alveolares e nos macrófagos (Hébert et al., 2000).

Com base no que foi exposto, os tratamentos realizados durante a lactação permanecem em sua maioria sendo considerados ineficientes para casos de mastites causadas por *S. aureus*. No entanto, tem-se observado uma maior taxa de cura para infecções estafilocócicas com a realização de terapia de vaca seca (TVS), que consiste na infusão intramamária de um antimicrobiano apropriado de longa duração, no período de secagem da vaca (Fraser, 1991; Cunningham & Klein, 2008; Wattiaux, 2013). Neste caso, os antimicrobianos intramamários são formulados em veículos de liberação e absorção lentas (Cunningham & Klein, 2008). Assim, permite-se um tempo prolongado de persistência do antimicrobiano dentro da glândula mamária, com o objetivo de eliminar possíveis infecções existentes e prevenir novas infecções quando se iniciar um novo período de lactação. O sucesso da terapia depende do tempo de liberação e do agente de transporte da formulação, bem como do tamanho das partículas e da capacidade de difusão do antibiótico (Blowey & Edmondson, 1999). Novas estratégias terapêuticas estão sendo investigadas como imunomoduladores e novas formulações de lipossomas, micropartículas e nanopartículas capazes de permitir a absorção do componente ativo por fagócitos e assim prolongar a atividade antibacteriana (Gruet et al., 2001). Spinosa et al. (2011) e Pond et al. (2011), alertaram ainda sobre a importância de se considerar a difusão de medicamentos e agentes tóxicos para o leite e a relevância quando se considera a possibilidade de contaminação da população, podendo levar ao desenvolvimento de quadros alérgicos e demais questões de saúde humana e resistência animal. Logo, fica evidente a importância de se produzir e ofertar à população um produto seguro e livre de contaminantes. A terapia deve ser

economicamente viável e não deve aumentar o risco de resíduos de antimicrobianos no leite comercializado.

É importante ressaltar que em sistema orgânico de produção de leite é restrita a utilização de produtos anti-sépticos comerciais como pré e pós-dipping, o que pode contribuir para a ocorrência de infecções intramamárias, principalmente pelos patógenos contagiosos (Langoni et al., 2009). Os mesmos autores sugerem a utilização de produtos bioterápicos na realização de pré e pós-dipping. Similarmente, de acordo com as normas estabelecidas na legislação brasileira de produção de leite orgânico, a TVS também não seria viabilizada devido às restrições de uso de antimicrobianos convencionais. De acordo com a Instrução Normativa nº 64, de 18 de dezembro de 2008, “a produção animal orgânica deve manter a higiene e a saúde em todo o processo criatório, obedecendo à legislação sanitária vigente para a produção de leite e adotando o uso de produtos e medicamentos permitidos na prevenção e tratamento de enfermidades dos animais orgânicos como, por exemplo, detergentes neutros e biodegradáveis e fitoterápicos” (Brasil, 2008).

Mesmo diante da rápida expansão da produção de alimentos orgânicos, este setor enfrenta grandes dificuldades pela falta de agentes antimicrobianos eficazes que possam ser utilizados nos sistemas de produção. Nesse sentido e também na busca por alternativas à terapêutica da mastite bovina, diversos estudos têm sido conduzidos através do uso produtos naturais.

Em estudo participativo sobre práticas etnoveterinárias conduzido no Paquistão foram documentadas 25 espécies de plantas para o tratamento e profilaxia de mastite bovina e bubalina (Dilshad et al., 2010). As espécies mais comuns destacadas foram: pimenta, pimentão, agrião, alho, gergelim, limão, gengibre, açafraão, cominho, trigo, arruda, entre outras. Estudos mais específicos também estão descritos, como por exemplo, o da avaliação da atividade antimicrobiana de extratos aquosos e alcoólicos da parte aérea de

Brachiaria sp, *Cenchrus ciliaries*, *Abutilon indicum* e *Coccinia grandis* contra patógenos causadores de mastite bovina (Mubarack et al., 2011). Os resultados desse trabalho revelaram que o extrato das quatro plantas testadas possuía atividade antimicrobiana potencial contra *S. aureus*, *E. coli*, *S. agalactiae*, e *K. pneumoniae*. Na mesma linha de pesquisa, Das et al. (2009), avaliaram *in vitro* a atividade antibacteriana do extrato aquoso e metanólico de erva-de-touro e de bisnagueira contra patógenos isolados de leite mastítico. O extrato metanólico de ambas as plantas mostrou atividade significativa contra *Staphylococcus aureus* coagulase positivo e *Streptococcus agalactiae*. Similarmente, foi avaliada a atividade antimicrobiana do óleo de canela aromática contra os principais patógenos causadores de mastite bacteriana bovina, revelando o alto potencial antimicrobiano do óleo sugerindo o seu uso em fazendas leiteiras orgânicas (Zhu et al., 2016).

Diante do exposto, tanto no sistema convencional como na produção orgânica, deve-se buscar alternativas de tratamento para o controle da mastite, capazes de reduzir ou substituir o uso de produtos antimicrobianos convencionais. Destaca-se, neste contexto, o potencial de produtos naturais, a exemplo da própolis.

1.2 Própolis

A própolis é uma substância resinosa produzida pelas abelhas, através da colheita de diversas partes das plantas e exsudatos, para vedação e assepsia de colméias. É também utilizada pelo homem por possuir propriedades antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante, cicatrizante, anti-séptica, imunomodulatória, entre outras (Castaldo & Capasso, 2002). De maneira geral, a própolis é constituída por 50 a 60% de resinas e bálsamos, 30 a 40% de ceras, 5% de pólen, mesclas mecânicas, substâncias minerais e oligoelementos, e vitaminas em pequenas proporções (Veronez, 2000). Mesmo sendo constituída principalmente por resinas e ceras, seu potencial biológico é devido

principalmente a presença de compostos do metabolismo secundário das plantas como ácidos fenólicos, flavonoides, ésteres e terpenos (Santana et al., 2012; Andreu et al., 2015; Fiordalisi et al., 2016). No entanto, como é o produto da colheita de diversas partes de diferentes plantas, sua composição pode ser afetada por diversos fatores, como a biodiversidade do local, as características geográficas da região de coleta, o método de coleta empregado, sazonalidade e pela espécie produtora (Maraschin et al., 2012; Sforcin & Bankova 2011; Castro et al., 2007). Essas diferenças e peculiaridades podem resultar em cor, sabor, aroma e consistência diferentes (Figura 1).

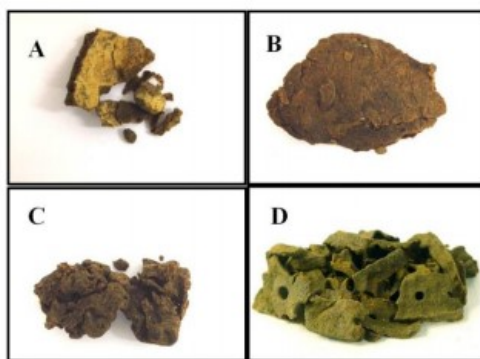


Figura 1. Amostras de própolis bruta de diferentes origens: (A) São Joaquim, (B) Água Doce, (C) Urupema, (D) Minas Gerais. Fonte: Fiordalisi et al., 2016.

Nesse contexto, destaca-se a importância de se conhecer a origem geográfica, a origem vegetal e a fenologia da planta hospedeira para um efetivo controle de qualidade e, até mesmo, para que a padronização das amostras de própolis possa garantir uma efetiva aplicação terapêutica (Park et al., 2002; Afrouzan et al., 2012). A região Sul brasileira apresenta uma grande diversidade vegetal para a retirada de resinas pelas abelhas, possibilitando a ocorrência de 5 grupos distintos de própolis de grande frequência (Park et al., 2002). Entretanto, em relação à composição da própolis, Sforcin (2007)

sugeriu a ausência de efeito da sazonalidade sobre a composição das amostras de própolis, as quais poderiam ser utilizadas independentemente da época de produção, uma vez que as variações são, segundo o autor, na maioria das vezes, quantitativas. Porém, o mesmo autor alerta que é necessário conhecer a constituição química da própolis e garantir que esta seja produzida e coletada na mesma região geográfica. Por outro lado, verifica-se que a atividade antibacteriana do extrato etanólico da própolis contra bactérias gram-positivas tem correlação positiva com os teores de flavonoides (Gonsales et al., 2006). As diferenças nos teores de flavonoides podem estar relacionadas ao local de origem e a diferentes práticas dos apicultores (Silva et. al, 2012). De fato, diversos estudos tem relatado que própolis coletadas em diferentes épocas do ano podem apresentar diferentes propriedades biológicas (Park et al., 2000; Meneghelli et al., 2013; Fiordalisi et al., 2016). Em estudo realizado pelo grupo de pesquisa proponente, encontrou-se que o extrato oriundo de Urupema apresentou baixo conteúdo de flavonoides comparado ao de outras origens de SC, mas uma importante atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e baixa toxicidade às células de explantes da glândula mamária bovina (Fiordalisi et al., 2016). Tais resultados, sugeriram uma composição química diferenciada para a própolis de Urupema e um maior potencial de uso intramamário.

Em termos de marcadores químicos, Bankova et al. (2000), mostraram que a própolis oriunda do Brasil que possui *Baccharis* spp. como fonte vegetal (própolis verde), possui o ácido p-cumárico como composto majoritário, enquanto as de *Araucária* spp. têm ácidos diterpênicos. Já Maraschin et al. (2012), ao avaliarem o perfil de amostras de própolis do município de São Joaquim – SC, que apresentam um perfil químico similar à própolis verde, identificaram a artemelina C como composto majoritário. O ácido p-cumárico representou o terceiro composto mais abundante nas amostras.

A investigação do uso da própolis no tratamento da mastite bovina vem sendo alvo de diferentes estudos. Saeki et al. (2011), por exemplo, ao avaliarem a incidência de mastite em 63 animais,

encontraram crescimento de *S. aureus* em 38 deles, e destes, 35 (92,10%) apresentaram sensibilidade ao extrato alcoólico de própolis 30%, em testes *in vitro*. Pinto et al. (2001), também avaliaram o efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. Os autores encontraram que o extrato de própolis comercial, o preparado de extrato etanólico e, em menor proporção, o metanólico, inibiram o crescimento das amostras de bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase negativos e *Streptococcus agalactiae*. Silva et al. (2012), também encontraram resultados positivos em relação aos efeitos da própolis. Destacaram que *S. aureus* foi mais sensível ao efeito da própolis que *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Além disso, Santana et al. (2012), ao avaliarem 60 gerações de cultivo, verificaram que a resistência a variadas concentrações de própolis frente a *S. aureus* não foi facilmente encontrada, principalmente devido a própolis ser uma matriz complexa que contém muitos constituintes químicos com ação sinérgica.

Apesar das reconhecidas propriedades da própolis no controle da mastite bovina causada por *S. aureus*, suas características hidrofóbicas inerentes à sua composição química, obrigam a utilização de solventes orgânicos, como por exemplo etanol, para sua solubilização, limitando o uso intramamário. Logo, associar a própolis à nanotecnologia pode ser uma alternativa promissora para o tratamento da mastite bovina através do desenvolvimento de sistemas aquosos nanoestruturados monodispersos e estáveis por considerável período de tempo. Tais sistemas, por serem desenvolvidos em água, por si só já representam uma grande vantagem em relação às possibilidades de administração.

1.3 Nanotecnologia

A nanotecnologia é definida como a aplicação de conhecimentos científicos para a manipulação da matéria e controle

em escala nanométrica (Nogi et al., 2012). A nanotecnologia permite aos pesquisadores criar, explorar e manipular materiais com propriedades químicas, físicas e biológicas que diferem do seu material de origem, em escala nanométrica (FDA, 2015). Um nanômetro corresponde a 1×10^{-9} metro, ou um bilionésimo do metro (Figura 2).

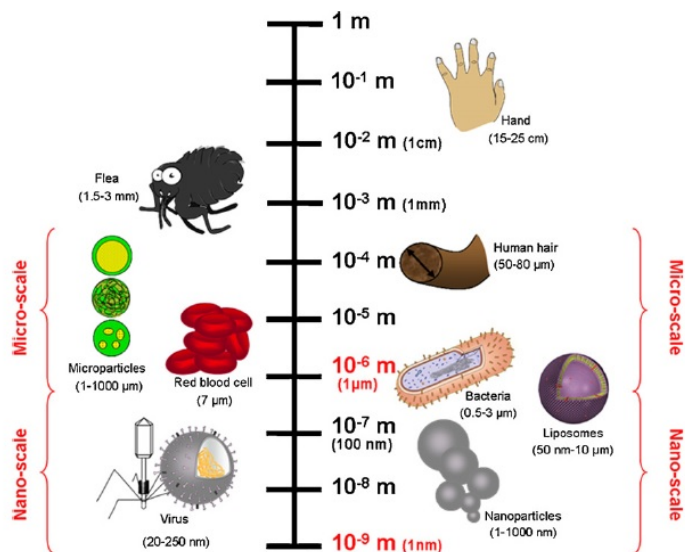


Figura 2. Escala de tamanho de nanomateriais em comparação com vários componentes biológicos. Fonte: Irache et al., 2011.

A aplicação da nanotecnologia no desenvolvimento de nanopartículas tem sido amplamente investigada. A associação de fármacos à nanopartículas pode, segundo Troncarelli et al. (2013), proporcionar a utilização de novas moléculas e ativos em terapêutica animal, assim como novas perspectivas de vias de administração de medicamentos e vacinas. Nesse sentido, um estudo recente utilizou a nanotecnologia como ferramenta de diagnóstico da mastite bovina, através do desenvolvimento de um biossensor colorimétrico para detecção de mastite em leite e produtos lácteos (Chinnappan et al., 2017).

As nanopartículas têm a capacidade de apresentar novas características físicas e químicas, apresentando alta efetividade, altos níveis de solubilidade e melhor estabilidade do que os agentes ativos originais (Troncarelli et al., 2013). Elas podem ser quimicamente mais reativas e mais bioativas que partículas maiores. Por possuírem tamanho muito reduzido, as nanopartículas também têm um acesso biológico muito maior e por isso entram mais facilmente nas células, tecidos e órgãos (Troncarelli et al., 2013). Uma importante razão para a utilização de nanopartículas é a sua grande área superficial que propicia fácil transporte devido a sua dimensão reduzida (Butnariu et al., 2011). Outra característica relevante das nanopartículas é a possibilidade de ser usada no controle da liberação de fármacos, ocasionando menores efeitos colaterais e uma recomendação de dosagem inferior (Schaffazick et al., 2003). Diante do exposto, a nanotecnologia constitui-se em uma disciplina de crescente interesse nas mais diversas áreas de aplicação. O termo nanopartícula, aqui utilizado, pode incluir as nanocápsulas e as nanoesferas, que diferem entre si por sua composição e organização estrutural.

O desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas pode ser realizado por diversos métodos como a homogeneização por alta pressão, a formação de microemulsão, precipitação, injeção de solvente ou deslocamento do solvente, inversão de fase, emulsão múltipla, ultra-som e a técnica da membrana contratante (Puri et al., 2009). Alguns mais simples e de custo energético inferior, outros mais complexos e dispendiosos. A aplicação do método de difusão do solvente a quente possibilita o desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas, como as nanopartículas de própolis. Como referido anteriormente, de acordo com Lustosa et al. (2008), a própolis é uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico e sua composição química inclui flavonóides, ácidos aromáticos, terpenóides e fenilpropanóides, ácidos graxos e vários outros compostos. Então, em termos de classificação, as nanopartículas lipídicas sólidas são partículas constituídas por lipídios sólidos a temperatura ambiente, que apresentam tamanho médio de partícula entre 50 a 1000 nm (Müller et al., 2000). Segundo Brandão (2011), as nanopartículas de própolis têm aplicações em diversos campos como o agroquímico, farmacêutico

cosmético ou químico. O nanodimensionamento da própolis modifica as suas características físicas e químicas, podendo, por exemplo, melhorar a sua solubilidade em água ou a eficiência de seus efeitos biológicos. O preparo e a estabilidade de nanopartículas lipídicas sólidas baseia-se no uso de surfactantes (Puri et al., 2009). É importante destacar que para a própolis, já se encontra disponível um pedido de registro de patente WO2012054999 A1 (Brandão, 2011), que se refere ao processo de obtenção e uso de composições constituídas de nanoprópolis.

Extratos de própolis são reconhecidos por sua ação antimicrobiana, característica que garante a assepsia das colméias. No entanto, além das variações de composição química em função do local de produção, sua baixa solubilidade em água continua sendo um entrave à sua utilização. Diante do exposto, é de interesse desenvolver estudos da associação da própolis à nanotecnologia, através do desenvolvimento de formulações aquosas estáveis, capazes de proporcionar novas alternativas de aplicação e administração.

2. Nanopartículas de própolis

O artigo a seguir descreve o desenvolvimento das nanopartículas de própolis e a avaliação *in vitro* do seu potencial antimicrobiano e citotóxico como produto terapêutico potencial visando o tratamento e controle da mastite bovina.

Publicação: Development of propolis nanoparticles for the treatment of bovine mastitis and in vitro evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities

DEVELOPMENT OF PROPOLIS NANOPARTICLES FOR THE TREATMENT OF BOVINE MASTITIS AND IN VITRO EVALUATION OF ANTIMICROBIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITIES

Gabriela T. B. P. Machado, * Maria B. R. Veleirinho, † Letícia Mazzarino,
* Luiz C. P. Machado Filho, † Marcelo Maraschin, * Shirley Kuhnen

*Department of Animal Sciences, Agrarian Sciences Centre, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, 88034-001

†NanoBioMat Laboratory, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, 88040-900

Corresponding author: shirley.kuhnen@ufsc.br

Address: Admar Gonzaga, 1346 - Itacorubi, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, 88034-000

Phone: 55 48 37215256

ABSTRACT

The present study describes the development of propolis nanoparticles and the evaluation of their antimicrobial and in vitro cytotoxic effects aiming at the treatment of bovine mastitis. Three propolis nanoparticle suspensions (NP-1, NP-2, and NP-3) were prepared using the hot solvent diffusion method, with varying concentrations of propolis extract (5 and 7 %, m/v) and surfactants: poloxamer (1, 3, and 4 %, m/v) and soy lecithin (0.25, 0.7, and 1 %, m/v). The nanoparticles were spherical, with a monodisperse distribution (PDI < 0.2), and an average particle size between 181 and 201 nm. The level of total phenolics varied between 145 and 167 µg gallic acid equivalents/mg and the encapsulation efficiency was greater than 73%. All formulations remained stable over a 150-day period of storage at room temperature. The three propolis nanoparticles presented antimicrobial activity against a standard strain of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and mastitic milk isolates and their effectiveness was dependent on the formula and concentration. The minimum inhibitory concentration (MIC) values for suspensions NP-1, NP-3, and the crude extract were 156 µg/mL. For NP-2, the MIC was 310 µg/mL. The analysis of in vitro cytotoxicity showed that the nanoparticle suspensions and the crude extract affect the cellular viability of MAC-T bovine mammary epithelial cells. The 50% concentration inhibition (IC₅₀) values for NP-1, NP-2, NP-3, and the extract were 159.1, 122.2, 145.3, and 268.4 µg/mL, respectively. The results showed that the encapsulation of propolis in nanoparticles represents a promising alternative to obtain stable systems, permitting higher concentrations of extract in an aqueous medium. However, the antimicrobial activity of nanoparticles was accompanied by cytotoxicity to the MAC-T cell line. Therefore, caution is advised in its use and application.

Keywords: propolis, nanotechnology, bovine mastitis, *Staphylococcus aureus*, MAC-T mammary epithelial cell.

INTRODUCTION

Mastitis is considered an important and frequent disease that affects dairy herds and, in many cases, it is responsible for significant productive and economic losses (Erskine et al., 2003). In Brazilian dairy farms, the reduction in milk production due to mastitis is the main component of the economic impact of the activity, followed by the culling of cows with chronic infections and the milk disposal (Guimarães et al., 2017). Mastitis is a process of inflammation of the mammary gland, mostly caused by bacteria. The treatment is based almost exclusively on the use of conventional antimicrobial products that are commonly available. Among the bacteria that cause mastitis, *Staphylococcus* sp. are important microorganisms in the pathology of infectious mastitis in dairy herds, with frequent cases presenting resistance to commercial antimicrobials (Vintov et al., 2003; Feng et al., 2016). Furthermore, the *Staphylococcus aureus* species has been recognized as an agent of bovine mastitis that is difficult to control due to its ability to survive in bovine cells and due to its ability to form abscesses (Hébert et al., 2000; Gruet et al., 2001; Erskine et al., 2003).

Attempts to solve the general problem of mastitis often include the indiscriminate use of antimicrobials which has led to their residues being detected in milk (Rama et al., 2016). It is important to emphasize that in Brazil, mastitis sanitation is most often carried out by the farmers themselves, who perform the antimicrobial treatment, without knowledge of the etiology and the correct protocol of use. Veterinary monitoring in dairy farms is not a recurring practice. Therefore, the excessive and inappropriate use of commercially available antimicrobials contributes to the development of microbial resistance. Due to the lack of effective treatments there is a clear need to identify new products with antimicrobial effects and develop new strategies to control the disease. As such, the use of treatments based on propolis, which enables a reduction in the use of antibiotics and contributes to milk quality, has been investigated highlighting important findings (Santana et al., 2012; Fiordalisi et al., 2016; Wang et al., 2016). Propolis is a resinous substance produced by bees through

the collection of diverse plant parts and exudates for the sealing and asepsis of hives. It is principally made up of resins and waxes, but its biological potential is mostly related to the presence of compounds such as phenolic acids, flavonoids, esters and terpenes (Santana et al., 2012; Andreu et al., 2015; Fiordalisi et al., 2016). It has been used by humans since antiquity because of its wide range of biological properties, such as antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, among others (Castaldo and Capasso, 2002). However, a few studies have underscored the fact that propolis samples collected from distinct locations and with different botanical origins can present diverse biological properties (Park et al., 1998; Yongkun et al., 2000; Dausch et al., 2008; Fiordalisi et al., 2016).

Despite the evidence supporting the potential use of propolis, the development of products based on the substance is a challenge due to its low solubility in water. To confront this limitation and improve its therapeutic efficiency, nanostructure of propolis, such as nanoparticles i.e., solid lipid nanoparticles, in aqueous suspensions have been investigated. Solid lipid nanoparticles are particles made up of solid lipids at room temperature that present an average particle size between 50 and 1000 nm (Müller et al., 2000). The advantages of the use of nanoparticles include the protection of the active agent against degradation, vectorization at the site of action, controlled and sustained liberation, as well as the possibility of administering active lipophilic in an aqueous medium (Mohanraj and Chen, 2006). The association of propolis with nanostructured systems appears to be a promising alternative for its intramammary administration, aiming at the treatment of bovine mastitis. In this context, it is necessary to study the development of stable nanoparticle formulations, with high encapsulation efficiency associated with the desired biological activity and low toxicity. As such, the present study describes the development of propolis nanoparticles and evaluates their *in vitro* antimicrobial activity against a standard strain of *S. aureus* and isolates of mastitic milk, and the cytotoxicity for MAC-T mammary epithelial cells.

MATERIALS AND METHODS

Propolis extraction

The propolis samples were provided by apiarists located in the municipality of Urupema, Santa Catarina State, Brazil, who are members of the Federation of Beekeepers' Associations of Santa Catarina (FAASC). The samples were chosen based on previous studies of brazilian propolis (Maraschin et al., 2012; Fiordalisi et al., 2016). Therefore, the samples chosen for the present study were collected during the months of October and November in the spring of 2014 and 2015. In the laboratory, the samples were processed to remove any eventual inclusions, then crushed and stored in hermetic plastic containers at -18°C. For the preparation of hydroalcoholic extract, 20 g of the sample (dry weight) was separated, macerated with 200 mL (1:10 wt / vol) of ethanol 70%, incubated in amber flasks, and kept in darkness for 24 h. After this period, the macerate was filtered in a vacuum and conditioned at -20°C for a further 24 h. The extracts were then centrifuged for 5 minutes (10,000 rpm) and the supernatant collected and evaporated at 60°C to completely remove the solvent (Fiordalisi et al., 2016). These extracts were used to prepare three different propolis nanoparticles.

Preparation of propolis nanoparticles

Suspensions of propolis nanoparticles were prepared using the hot solvent diffusion method (Hu et al., 2002). Briefly, an organic phase containing dry propolis extract (5 and 7 %, m/v) and soy lecithin Lipoid S75® (0.25, 0.7 and 1 %, m/v) in 12 mL of ethanol was submitted to magnetic agitation and heated to 60°C until complete solubilization. The organic phase was then added drop by drop in 26 mL of aqueous phase containing poloxamer 188 (1, 3, and 4 %, m/v) (Kolliphor P188 - PEO₈₀ -PPO₂₇ -PEO₈₀), a triblock copolymer was kindly donated by BASF Chemical Company (Ludwigshafen, Germany). The system was preheated to 60°C, under moderate magnetic agitation. After the

formation of the nanoparticles, the formulation was stirred for 20 minutes. The organic solvent was removed in a rotary evaporator (60 °C) and the final volume adjusted to 10 mL. Subsequently, the nanoparticle suspension was filtered using filter paper with a pore size of 8 µm (J-Prolab, São José dos Pinhais, Brazil). In order to optimize the preparation conditions, varying concentrations of propolis extract, poloxamer, and lecithin were used (Table 1).

Table 1. Composition of the developed suspensions of propolis nanoparticles (NP).

	NP-1	NP-2	NP-3
Propolis extract (%)	5	5	7
Soy lecithin (%)	0.25	0.7	1.0
Poloxamer (%)	1	3	4
Water (%)	q.s 100	q.s 100	q.s 100

Determining particle size, polydispersity index and zeta potential

The particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential were assessed using photon correlation spectroscopy and Laser Doppler Anemometry, respectively, in a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The samples were diluted in Milli-Q® ultrapure water and analyzed at 25°C. To determine the zeta potential, previously diluted samples were placed in electrophoretic cells where a potential of ± 150 mV was established. The values for zeta potential were calculated as average values of electrophoretic mobility using Smoluchowski's equation.

Defining pH

The pH of the nanoparticle suspensions was measured using a pHmetro (HANNA hi2221, São Paulo, Brazil), previously calibrated with buffer solutions of pH 4.0 and 7.0.

Total phenolics and encapsulation efficiency

To determine the total phenolic content in the suspensions of propolis nanoparticles, we used the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method (Singleton and Rossi, 1965). The content was calculated from a calibration curve, using gallic acid as a standard compound (10-100 µg/mL; $R^2=0.970$). The results were expressed as µg of gallic acid equivalents (GAE) per mg of extract. The encapsulation efficiency (%) was estimated as the difference between the total phenolic concentration in the suspensions of nanoparticles and the phenolic concentration present in the ultrafiltrate obtained through the ultrafiltration/centrifugation procedure, using Amicon filter devices containing Ultracel-100 filter membranes (100 kDa, Millipore Corp., USA).

Morphology

The morphology of the nanoparticles was analyzed using transmission electron microscopy (JEOL JEM 1011 TEM). Nanoparticle suspensions previously diluted in Milli-Q® ultrapure water were placed on carbon coated copper grids and negatively stained with 2% (m/v) uranyl acetate.

Analysis of stability

To assess stability, the formulations NP-1, NP-2, and NP-3 were stored in amber flasks at room temperature. The system stability was evaluated by monitoring particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential, and pH after 0, 7, 14, 21, 28, 35, 60, and 150 days of storage. At the end of the study, the morphology of the nanoparticles was also evaluated.

Antimicrobial tests

The suspensions of propolis nanoparticles were tested against a standard strain of *S. aureus* ATCC 25923 and seven different isolates of mastitic milk from pasture-based production systems herds in southern Brazil. The standards of microbial resistance showed by the isolates used in the present study are presented in table 2.

Table 2. Antimicrobial resistance* of seven isolates of mastitic milk from Brazilian dairy herds.

Isolates	Resistants
19 A4	gentamicina and neomycin
23 A1	sulfametazone
19 A2	ampicillin and penicillin
4 D	sulfametazone
10 D	sulfametazone and tetracycline
11 B3	no resistance
17 B1	gentamicin and sulfametazone

* The assays included Ampicillin, Gentamicin, Neomycin, Oxacillin, Penicillin, Sulfametazone and Tetracycline.

To assess antimicrobial activity we used the broth microdilution method to determinate the minimum inhibitory concentration (MIC) according to CLSI (2003). For each formulation, we tested eight different concentrations varying from 39 to 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against eight inoculum. Dilutions of suspensions of nanoparticles were prepared in 100 μL of Muller-Hinton broth. The initial population density of inoculum was standardized through turbidity control equivalent to a McFarland 0.5 standard solution (containing 10^7 to 10^8 CFU/mL) and 10 μL of a standard quantity of bacterial inoculum of 10^5 CFU/mL was added to each well and incubated at 37°C for 24 hours. The percentage of bacteria growth inhibition was determined by reading the absorbance at 625 nm of the microplate reader (EL808, Bio-TekInstruments, Inc), and using the following formula: MI: (%) = $[1 -$

(AT/AI) X 100. MI represents bacteria growth inhibition, AT represents the mean absorbance of the nanoparticles suspensions concentrations tested with inoculum, subtracted from the absorbance value of the same nanoparticles suspensions concentrations without the addition of the inoculum, AI represents the mean absorbance of the control microbial growth. For comparison purposes, three formulations containing surfactants without propolis were tested, at the same concentrations, and considered as blank-nanoparticle. The MIC was determined as the concentration that did not show visible growth. The MIC was confirmed by addition of 50 μ L of resazurin (100 μ g/mL). For comparison purposes, the tests were also repeated with ethanolic crude extract of the same propolis from *Urupema* that was used to prepare the nanoparticles, solubilised in ethanol 8% (39 to 5000 μ g/mL).

Cytotoxicity in MAC-T cell lines

Epithelial cells of the bovine mammary gland (MAC-T) were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and supplemented following the culture conditions appropriate for the line. The medium was changed every 48 h and the cells maintained at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO₂. When the cells reached 70% confluence, they were treated with 0.25% trypsin in 1mM EDTA and kept in a Neubauer chamber. 10,000 cells were plated per well, followed by incubation for cellular adhesion. The effect of the nanoparticle suspensions (NP-1, NP-2, and NP-3) on the viability of MAC-T cells was assessed using the MTT method. For this, different concentration of three formulas, varying from 39 to 625 μ g/mL were added to the culture medium with adherent cells. After 24 h, the MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide; 0.5 mg/mL) was added. The quantity of formazan produced was measured at 546 nm (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc) and considered directly proportional to the number of viable cells. The cells cultivated in DMEM were considered as 100% viable cells. For comparison purposes, three formulations containing surfactants without propolis were

tested, at the same concentrations, and considered as blank-nanoparticle. The tests were repeated with crude extract of the Urupema propolis used to prepare the nanoparticles (39 to 625 µg/mL) solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO, 0,5%; Synth, São Paulo, Brazil). We also determined the IC₅₀, the concentration responsible for reduction of cellular viability by half.

STATISTICAL ANALYSES

The statistical analyses of propolis nanoparticles suspension were performed using analysis of variance (ANOVA), followed by the post-hoc Tukey test, using the GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The results from the evaluation of the percentage of inhibition of microbial activity were analyzed using the MIXED procedure in SAS version 9.2. The model included the fixed effect of the nanoparticle formulation (3 GL), the concentrations (7GL), and their interactions (21 GL), and the aleatory effect of isolates (7GL). Paired comparisons were determined using LSMEANS with a Tukey adjustment. Values of $P < 0.05$ were considered significant. The data were expressed as average \pm standard deviation (SD) and experiments were conducted in triplicate. We also determined the IC₅₀, or the concentration responsible for a reduction of cellular viability by half, through linear regression.

RESULTS AND DISCUSSION

Development of propolis nanoparticles

Suspensions of propolis nanoparticles were prepared successfully using the hot solvent diffusion method. In order to optimize preparation conditions, three main parameters were evaluated: propolis concentration, poloxamer, and lecithin. The obtained nanoparticle suspensions present a milky appearance with a yellow colour, which is characteristic of the propolis used (Figure 1).

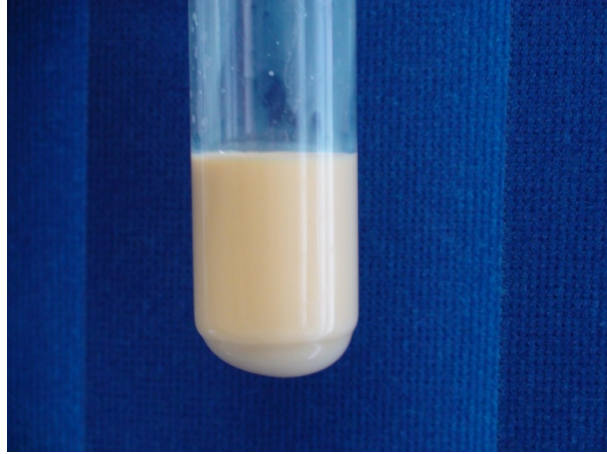


Figure 1: Propolis nanoparticle suspension.

The physico-chemical characteristics, i.e. size, polydispersity index (PDI), zeta potential, and pH, of the developed propolis nanoparticles are summarized in Table 3. The size distribution is expressed in Figure 2.

Table 3. Physico-chemical characteristics of the developed propolis nanoparticles.

	NP-1	NP-2	NP-3
Size (nm)	194.2 ± 6.6 ^a	181.2 ± 18.2 ^a	201.0 ± 10.2 ^a
PDI	0.109 ± 0.018 ^a	0.09 ± 0.031 ^a	0.118 ± 0.046 ^a
Zeta potential (mV)	-29.9 ± 1.7 ^a	-23.1 ± 0.3 ^b	-22.9 ± 1.4 ^b
pH	3.9 ± 0.1 ^a	4.2 ± 0.1 ^a	4.0 ± 0.0 ^a

Averages followed by different letters in the same line represent significant differences between nanoparticles (Tukey, P<0.05). Data are presented as mean ± standard deviation (SD) (n = 3).

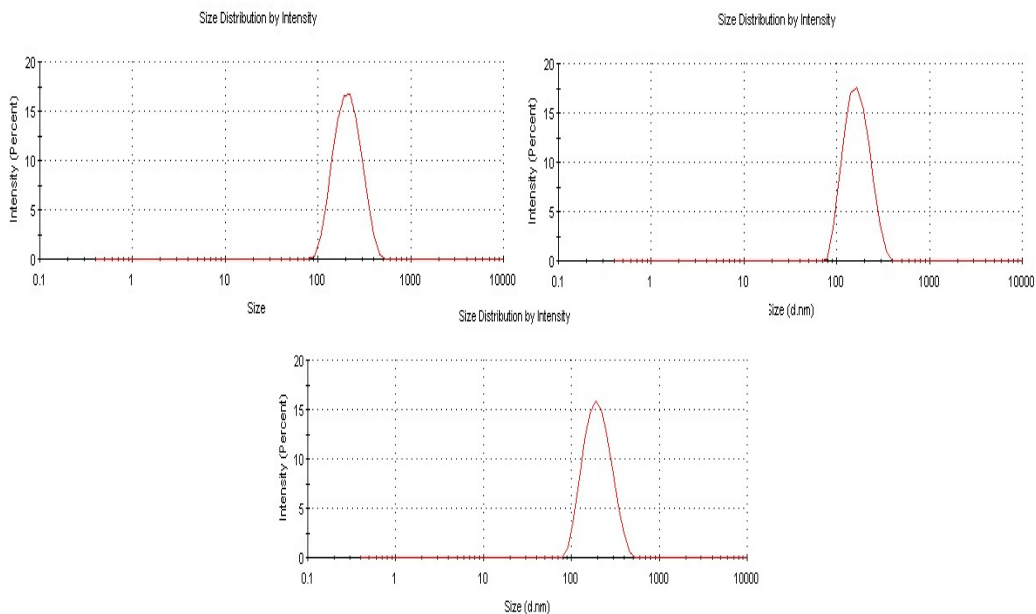


Figure 2. Size distribution by intensity of NP-1, NP-2 and NP-3 propolis nanoparticles, respectively .

We found no significant differences among particle size, PDI, and pH of the prepared nanoparticles with different concentrations of propolis and surfactants ($p < 0.05$). All formulations presented monodisperse distribution of particles (PDI < 0.2), with an average size of approximately 192 nm. The values for zeta potential were -29.9, -23.1, and -22.9 mV for NP-1, NP-2, and NP-3, respectively. The high negative charge is attributed to the presence of soy lecithin phospholipids on the particle surface. The zeta potential was significantly lower for NP-2 and NP-3 in comparison to NP-1 ($p > 0.05$) and this can be related to the greater concentration of non-ionic poloxamer surfactants (copolymer of ethylene and propylene oxides) that tend to mask the surface charge, reducing the absolute value of this parameter (Schaffazick et al., 2003; Mazzarino et al., 2010; Pooja et al., 2016). A relatively high value of zeta potential in the module is

considered important for good physico-chemical stability as it impedes the aggregation of particles in suspension (Schaffazick et al., 2003; Mohanraj and Chen, 2006; Mazzarino et al., 2010).

Based on analysis with the transmission electron microscope (TEM), all developed propolis nanoparticles presented a spherical form. The average diameter observed through TEM ranged from 160 to 220 nm, which is similar to the results found using photon correlation spectroscopy (Figure 3).

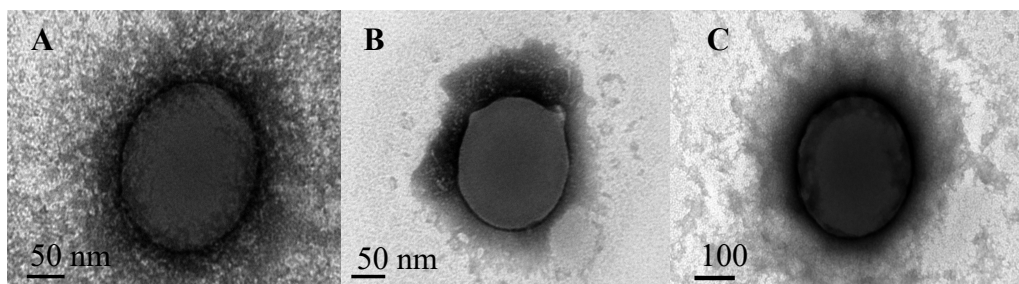


Figure 3. Transmission electron microscopy of nanoparticles NP-1 (A), NP-2 (B), and NP-3 (C).

Total phenolics and encapsulation efficiency

The level of total phenolics for formulations NP-1, NP-2, and NP-3 were 145, 159, and 167 μg of GAE/mg, respectively (Table 4).

Table 4. Total phenolics and encapsulation efficiency of the developed propolis nanoparticles.

	NP-1	NP-2	NP-3
Level of total phenolics (ug of GAE/mg)	145.17 ± 2.65 ^a	159.25 ± 23.32 ^{ab}	167.76 ± 12.49 ^b
Encapsulation efficiency (%)	73 ± 1.52 ^a	88 ± 2.90 ^b	91 ± 0.52 ^b

Averages followed by different letters in the same line represent significant differences between nanoparticles (Tukey, $P < 0.05$). Data are presented as mean ± standard deviation (SD) (n = 3).

The elevated level of total phenolics for NP-3 is likely related to a greater concentration of propolis extract in this formula. The encapsulation efficiency, in turn, was 73, 88, and 91% for NP-1, NP-2, and NP-3, respectively (Table 3) and variable according to the formulation ($p > 0.05$). This parameter could be influenced by the higher levels of surfactants in formulations NP-2 and NP-3 and the low solubility of propolis in aqueous phase external to the nanoparticle suspension. The wide variability of compounds present in the propolis matrix results in encapsulation efficiency values of less than 100%. As such, compounds that are more hydrophilic, in other words those that possess a greater affinity for the aqueous phase, are more difficult to encapsulate. The encapsulation efficiency values were significantly higher for formulations NP-2 and NP-3 when compared to NP-1, indicating that a higher concentration of surfactants is positively correlated with encapsulation efficiency.

Studies have highlighted that low concentrations of surfactants may be insufficient to cover the surface of nanoparticles, resulting in an aggregation of particles (Pooja et al., 2016). However, this did not occur in the present study. On the other hand, a high concentration of surfactants can lead to cytotoxic effects. This situation justifies the

need to study the development of stable nanoparticle formulations associated with the desired biological activity and toxicity levels.

Analysis of stability

The stability of the nanoparticle suspensions NP-1, NP-2, and NP-3, stored at room temperature (25°C), were assessed over a period of 150 days (Figure 4).

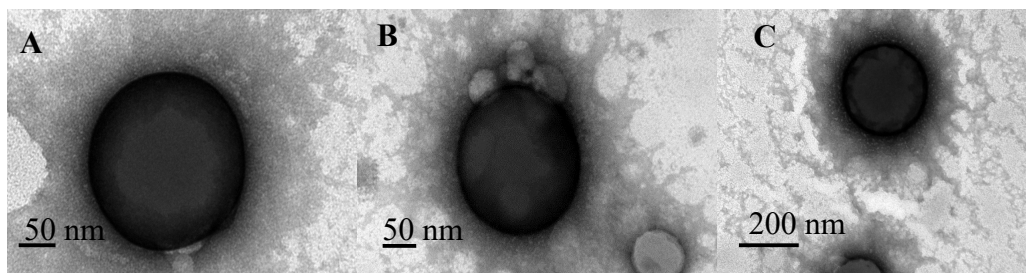


Figure 4. Transmission electron microscope of nanoparticles NP-1 (A), NP-2 (B), and NP-3 (C) after 150 days of stability testing.

Based on the data in Table 5, the formulations are stable, without extensive changes to particle size, PDI, and pH ($p < 0.05$).

Table 5. Average size, PDI, zeta potential, and pH of nanoparticles NP-1, NP-2, and NP-3 over 150 days of storage at room temperature.

		NP-1	NP-2	NP-3
Size (nm)	0 day	194.2 ± 6.6 ^a	181.2 ± 18.2 ^a	201.0 ± 10.2 ^a
	150 days	201.4 ± 5.5 ^a	188.0 ± 16.4 ^a	191.5 ± 5.6 ^a
PDI	0 day	0.109 ± 0.018 ^a	0.09 ± 0.031 ^a	0.118 ± 0.046 ^a
	150 days	0.127 ± 0.02 ^a	0.146 ± 0.02 ^a	0.122 ± 0.00 ^a
Zeta potential (mV)	0 day	-29.9 ± 1.7 ^a	-23.1 ± 0.3 ^b	-22.9 ± 1.4 ^b
	150 days	-32.0 ± 1.5 ^a	-34.0 ± 2.7 ^a	-32.8 ± 0.4 ^a
pH	0 day	3.9 ± 0.1 ^a	4.2 ± 0.1 ^a	4.0 ± 0.0 ^a
	150 days	4.0 ± 0.1 ^a	4.3 ± 0.0 ^a	4.2 ± 0.1 ^a

Averages followed by different letters in the same column represent significant differences between nanoparticles (Tukey, P<0.05). Data are presented as mean ± standard deviation (SD) (n = 3).

A significant increase in the zeta potential was observed for formulations NP-2 and NP-3 after 150 days of storage. This is possibly due to changes in the environment caused by the release of some propolis compounds that could influence the repulsion potential between the nanoparticles. Nevertheless, we did not observe visible tendencies of sedimentation, phase separation, or aggregation over time.

The average particle size, PDI, zeta potential, and pH are considered good indicators of suspended nanoparticle stability (Guterres et al., 1995; Schaffazick et al., 2003; Mohanraj and Chen, 2006). A rapid increase in particle size, for example, indicates low stability of the colloidal system (Bernardi et al., 2011). Important information about the stability of suspensions can be obtained by monitoring pH over time. Research has shown that nanoparticle suspensions containing diclofenac had their pH levels reduced over 3.5 months (Schaffazick et al., 2002). Similarly, studies have attributed the degradation of some compounds in coconut oil nanocapsules to changes in pH levels over 60 days of storage (Santos et al., 2014).

Considering the physico-chemical characteristics and the stability of the developed nanoparticle suspensions, all formulations were selected for assessment of biological activity.

Antimicrobial activity

The propolis nanoparticle suspensions and the crude extract were tested at concentrations of 39, 78, 156, 310, 625, 1250, 2500 and 5000 µg/mL. The three prepared suspensions and the extract reduced the growth of *S. aureus* ATCC 25923 and 7 different isolates of mastitic milk at all tested concentrations (Supplementary Material Figure 1). However, the effectiveness was dependent on the formulation and concentration. In comparison to the control, the NP-2 formulation showed lower antimicrobial activity with MIC of 310 µg/mL. The MIC presented by formulations NP-1, NP-3, and the raw extract were 156 µg/mL in comparison to the control (Figure 5).

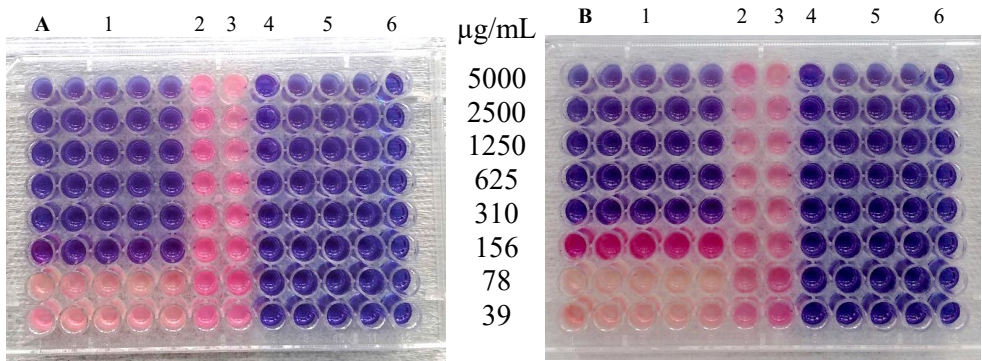


Figure 5. Image of a microwell plate showing the MIC of the nanoparticle suspensions NP-1 and NP-3 (A) and the MIC of NP-2 (B) after the addition of resazurin. 1 = broth + nanoparticles suspensions + inoculum; 2 = broth + blank nanoparticles + inoculum; 3 = broth + inoculum; 4 = broth + blank-nanoparticles; 5 = broth + nanoparticles suspensions; 6 = broth.

Concentrations equal to or greater than 156 $\mu\text{g/mL}$ for the nanoparticle suspensions NP-1 and NP-3 and for the crude propolis extract reduced the microbial activity by approximately 100% (Table 6).

Table 6. Reduction* in bacterial activity of *S. aureus* ATCC 25923 and 7 different isolates of mastitic milk for nanoparticle suspensions NP-1, NP-2, NP-3 and propolis crude extract at concentrations of 39 to 625 µg/mL.

Concentration (µg/mL)	NP-1	NP-2	NP-3	Propolis extract
39	2.2 ± 1.45 ^{Ac}	31.86 ± 28.41 ^{ABc}	36.36 ± 22.04 ^{Bc}	13.71 ± 11.92 ^{Ac}
78	44.79 ± 16.82 ^{Bb}	55.92 ± 23.18 ^{ABb}	69.80 ± 17.10 ^{Ab}	67.39 ± 18.51 ^{Ab}
156	99.47 ± 7.04 ^{Aa}	75.33 ± 14.00 ^{Bb}	100.74 ± 6.25 ^{Aa}	100.45 ± 5.23 ^{Aa}
310	102.55 ± 1.06 ^{Aa}	102.36 ± 2.94 ^{Aa}	101.83 ± 1.40 ^{Aa}	102.24 ± 3.21 ^{Aa}
625	102.09 ± 1.46 ^{Aa}	102.62 ± 2.26 ^{Aa}	101.40 ± 1.17 ^{Aa}	104.11 ± 2.45 ^{Aa}

*Reduction in bacterial activity expressed as a percentage of bacterial inhibition as the mean ± standard deviation. Averages followed by different uppercase letters in the same line represent significant differences between nanoparticles and the extract. Different lowercase letters in the same column represent significant differences between concentrations (Tukey, P<0.05).

The differences in antimicrobial activity between formulations is likely due to quantitative variations of surfactants in their composition which can result in varying levels of encapsulation efficiency (Table 3). The formulation NP-2, having the same quantity of propolis, greater quantities of surfactants in its composition, and higher percentage of encapsulation than NP-1, could require an interval longer than 24 h for more effective liberation of nanoparticles to occur. Studies of the antimicrobial activity of propolis nanoparticles prepared using a simple extraction and precipitation method showed that with an increase in the concentration of nanoparticles (5 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), the survival of *S. aureus* diminished (Jayakumar et al., 2013). Similar to the results found in the present study. It is important to note that in our analysis, the nanoparticle suspensions NP-1 and NP-3 did not present antimicrobial activity greater than the propolis extract.

On the other hand, research has shown that nanopropolis prepared through a grinding process was more effective than propolis extract against *S. aureus* at a concentration of 1 mg/mL (Afrouzan et al., 2012). Comparable results were also found for propolis nanoparticles that showed higher activity in comparison with the extract, as an antibacterial agent for gram-positive and gram-negative bacteria in concentrations of 0.02% to 10% v/v (Hasan et al., 2014). These nanoparticles, however, were prepared by homogenization at high velocity followed by encapsulation using maltodextrin and the solvent evaporation method. The differences found between previous and the present study can be related to variations in the formulations and preparation techniques employed, which can confer distinct physico-chemical characteristics on nanoparticles. Although formulations NP-1 and NP-3 did not show higher levels of activity in comparison with the propolis extract, the fact that they were prepared in an aqueous medium represents a significant advantage over ethanolic extract of propolis considering the potential for intramammary application to control of bovine mastitis.

Cytotoxicity

The assessment of *in vitro* cytotoxicity showed that the nanoparticle suspensions and the crude extract of propolis affected the cellular viability of MAC-T bovine mammary gland cells depending on the concentration. The formulation NP-2 presented higher cytotoxic effects than the crude extract at concentrations equal to or less than 78 $\mu\text{g}/\text{mL}$. It is important to note that this same formulation presented lower antimicrobial activity than the other formulations and the extract in the presence of *S. aureus* strains (Table 5). It is also interesting to highlight that NP-2 contains the same quantity of propolis as NP-1, but with higher quantities of surfactants. In excess, surfactants could be dissociated from nanoparticles and could be influencing cellular viability. However, it is important to note that the blank-nanoparticles, i.e., the three formulations of surfactants without propolis, were tested at the same concentration and did not reduce cell viability (Supplementary Material Figure 2 and 3). Excessive emulsifier molecules can be present in different molecularly solubilized forms, such as micelles or liposomes, increasing the risk of toxic effects (Mehnert and Mäder, 2001). Among the tested concentrations, we found that concentrations between 39 and 78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ maintained cellular viability above 50% for all formulations and for the tested extract. For the tested suspensions (NP-1, NP-2 and NP-3), the cytotoxicity was similar for all concentrations (Figure 6).

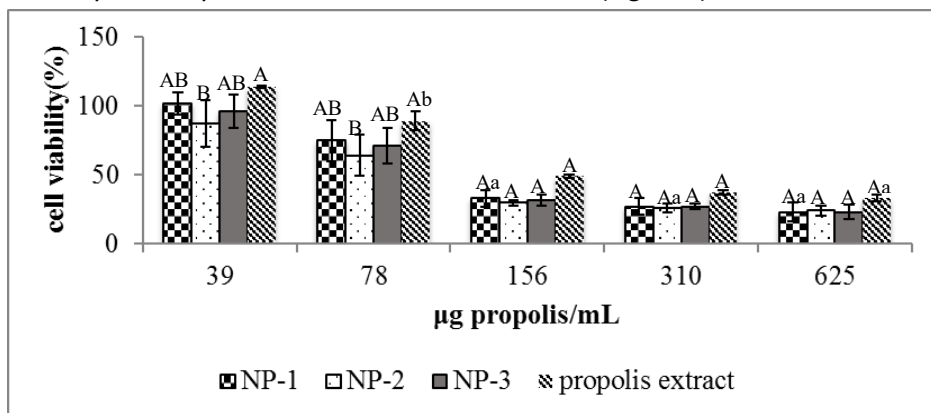


Figure 6. MAC-T cellular viability. Results expressed as percentage of viable cells \pm standard deviation. Different uppercase letters represent significant differences between nanoparticles NP-1, NP-2, NP-3 and the extract. Different lowercase letters represent significant differences among concentrations (Tukey, $P < 0.05$).

The IC_{50} values for formulations NP-1, NP-2, and NP3 were 159.1 ± 3.70 , 122.2 ± 6.87 , and 145.3 ± 4.47 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The IC_{50} value for the propolis extract used to prepare the nanoparticles was 268.4 ± 4.32 $\mu\text{g/mL}$. This result suggests a greater cytotoxic potential for nanoencapsulated propolis. In a previous study, the cytotoxicity of propolis nanoparticles against cancer cell lines using in the MTT analysis was tested. The authors found that particles with a concentration less than (5 $\mu\text{g/ml}$) did not present toxicity, while at greater concentrations (10, 50, and 100 $\mu\text{g/mL}$) the cellular viability was significantly reduced (Jayakumar et al., 2013). In a similar context, studies have found a greater therapeutic efficiency for nanoencapsulated propolis in relation to free extract, inducing a greater cytotoxic effect on carcinogenic cells, suggesting a dose one third the size than the free extract (Elbaz et al., 2016). In relation to the extract, studies have shown cytotoxic effects of Moroccan propolis extracts on tumor cells at much lower concentrations (Mouse et al., 2012). In this case, the IC_{50} values varied between 15 and 38 $\mu\text{g/mL}$ (Mouse et al., 2012). On the other hand, in an evaluation of the cytotoxic effects of red propolis from Northeastern Brazilian, the authors found IC_{50} values of 64 $\mu\text{g/mL}$ for tumor cells and values greater than 150 $\mu\text{g/mL}$ for normal human cells (da Silva Frozza et al., 2013). In general, these studies attribute the observed effects to the varying chemical components of propolis which must work synergistically.

The present study shows that the MIC of the crude extract used presented reduced cytotoxic effects for MAC-T cell lines. On the other hand, the MIC of the nanoparticle suspensions NP-1 and NP-3 were very similar to the IC_{50} values and the MIC of NP-2 was greater than the IC_{50} , suggesting the need for caution in its administration.

However, due to the intracellular survival capacity of *S. aureus* (Gruet et al., 2001) some reduction in cell viability may be of interest for achieving an effective control. In some level, a controlled damage to the host cell may be positive for targeting the pathogen. It is also important to note that the evaluation of cytotoxicity using culture of MAC-T cells is based on an in vitro test that, despite being of interest as a study model and comparison of the different extracts, dose extrapolation for in vivo model is limited. This is because, in vivo, several factors contribute to the establishment of doses and limits of toxicity, such as the presence of various cell types and extracellular components in the local tissue, the vascularization and diffusion capacity of the compounds, the presence of inflammatory cells among others. Thus, although nanostructured propolis systems are promising for intramammary delivery, further in vivo studies are needed to prove safety and efficacy.

CONCLUSION

The encapsulation of propolis in monodisperse nanoparticles using the hot solvent diffusion method proved to be a promising alternative to obtain systems containing high concentrations of extract in a stable aqueous medium for a considerable period of time. However, the studied nanoparticle suspensions showed differences in the quantity of surfactants in their composition can result in varying biological responses. The propolis nanoparticle suspensions showed antimicrobial potential against strains of *S. aureus*, particularly for formulations NP-1 and NP-3. Nevertheless, the antimicrobial activity of the nanoparticles can be accompanied by cytotoxic effects, depending on the concentration and the formulation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed by CNPq (Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Brasília, Brazil), through project number 403415 / 2013-6, Edital 39/2013. This study is part of Gabriela Tasso Bongioiolo Pinheiro Machado's Master's thesis in the Post-graduate program in Agrosystems at the Federal University of Santa Catarina (UFSC). The authors thank the apiculturists in Urupema for providing the raw propolis, as well as the LCME (Laboratório central de microscopia eletrônica, UFSC) and the LMBV (Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, UFSC).

REFERENCES

1. Afrouzan, H., C. Amirinia, S.A. Mirhadi, A. Ebadollahi, N. Vaseji, and G. Tahmasbi. 2012. Evaluation of antimicrobial activity of propolis and nanopropolis against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Afr J Microbiol Res.* 6: 421-425.
2. Andreu, G. L. P., F. H. Reis, F. M. Dalalio, Y. N. Figueredo, O. C. Rubio, S. A. Uyemura, and L. C. Alberici. 2015. The cytotoxic effects of brown Cuban propolis depend on the nemorosone content and may be mediated by mitochondrial uncoupling. *Chem. Biol. Interact.* 228: 28-34.
3. Bernardi, D. S., T. A. Pereira, N. R. Maciel, J. Bortoloto, G. S. Viera, G. C. Oliveira, and P. A. Rocha-Filho. 2011. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. *J nanobiotechnology.* 9: 44.
4. Castaldo, S., and F. Capasso. 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia.* 73: S1-S6.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (2003). *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. Informational Supplement M7-A6, CLSI.* Available: http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/manuais/clsi/clsi_OPA SM7_A6.pdf. Accessed 20 May 2017.

6. da Silva Frozza, C. O., C. S.C. Garcia, G. Gambato, M. D. O. de Souza, M. Salvador, S. Moura, and O. A. Dellagostin. 2013. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol.* 52: 137-142.
7. Dausch, A., C. S. Moraes, P. Fort, and Y. K. Park. 2008. Brazilian red propolis—chemical composition and botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med.* 5: 435-441.
8. Elbaz, N. M., I.A. Khalil, A. A. Abd-Rabou, and I. M. El-Sherbiny. 2016. Chitosan-based nano-in-microparticle carriers for enhanced oral delivery and anticancer activity of propolis. *Int. J. Biol. Macromol.* 92: 254-269.
9. Erskine, R. J., S. Wagner, and F. J. DeGraves. 2003. Mastitis therapy and pharmacology. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 19: 109-138.
10. Feng, Y., W. Qi, X. R. Wang, W. A. Ling, X. P. Li, J. Y. LUO, and H. S. Li. 2016. Genetic characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Northwest China. *J. of Integrative Agriculture*, 15: 2842-2847.
11. Fiordalisi, S. A., L. A. Honorato, M. R. Loiko, C. A. Avancini, M. B. Veleirinho, L. C. Machado Filho, and S. Kuhnen. 2016. The effects of Brazilian propolis on etiological agents of mastitis and the viability of bovine mammary gland explants. *J. dairy Sci.* 99: 2308-2318.
12. Fiordalisi, S.A.L., M.B.R. Veleirinho, L. Honorato, S. Kuhnen. 2017. Influência da sazonalidade sobre a composição química da própolis de Urupema, Santa Catarina. V Congresso Latinoamericano De Plantas Medicinales, La Paz, Bolívia.
13. Guimarães, J. L., M. A. Brito, C. C. Lange, M. R. Silva, J. B. Ribeiro, L. C. Mendonça, and G. N. Souza. 2017. Estimate of the economic impact of mastitis: A case study in a Holstein dairy herd under tropical conditions. *Preventive Veterinary Medicine.* 142: 46-50.

14. Gruet, P., P. Maincent, X. Berthelot and V. Kaltsatos. 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced drug delivery reviews*, 50: 245-259.
15. Guterres, S. S., H. Fessi, G. Barratt, J. P. Devissaguet, and F. Puisieux. 1995. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. *Int J Pharm.* 113: 57-63.
16. Hasan, A. E. Z., L. Ambarsari, W. K. Widjaja, and R. Prasetyo. 2014. Potency of Nanopropolis Stinglessbee *Trigona* spp Indonesia as Antibacterial Agent. *IOSR J Pharm.* 4: 01-09.
17. Hébert, A., K. Sayasith, S. Sénéchal, P. Dubreuil, and J. Lagacé. 2000. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol Lett.* 193: 57-62.
18. Hu, F. Q., H. Yuan, H. H. Zhang, and M. Fang. 2002. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *Int J Pharm.* 239: 121-128.
19. Jayakumar, R., C. Ramya, P. S. Kumar, K. S. Snima, V. K. Lakshmanan, and S. V. Nair. 2013. In Vitro Anti-Cancerous and Anti-Microbial Activity of Propolis Nanoparticles. *J Nanopharm Drug Deliv.* 1: 150-156.
20. Maraschin, M., A. R. S. Zeggio, S. K. Oliveira, S. Kuhnen, M. M. Tomazzoli, A. C. M. Zeri, R. Carreira, and M. B. A. Rocha. 2012. A machine learning and chemometrics assisted interpretation of spectroscopic data—A NMR-based metabolomics platform for the assessment of Brazilian propolis. Pages 129–140 in *Pattern Recognition in Bioinformatics. Lecture Notes in Computer Science.* vol. 7632. T. Shibuya, H. Kashima, J. Sese, and S. Ahmad, ed. Springer, Berlin, Germany.
21. Mazzarino, L., C. L. Dora, I. C. Bellettini, E. Minatti, S. G. Cardoso, and E. Lemos-Senna. 2010. Curcumin-loaded polymeric and lipid nanocapsules: preparation, characterization and chemical stability evaluation. *Lat Am J Pharm.* 29: 933-40.

22. Mehnert, W., and K. Mäder. 2001. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47: 165-196.
23. Mohanraj, V. J., and Y. Chen. 2006. Nanoparticles-a review. *Trop J Pharm Res.* 5: 561-573.
24. Mouse, H. A., M. Tilaoui, A. Jaafari, L. A. M'barek, R. Aboufatima, A. Chait, and A. Ziad. 2012. Evaluation of the in vitro and in vivo anticancer properties of Moroccan propolis extracts. *Rev Bras Farmacogn.* 22: 558-567.
25. Müller, R. H., K. Mäder, and S. Gohla. 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.* 50: 161-177.
26. Park, Y. K., M. H. Koo, J. A. Abreu, M. Ikegaki, J. A. Cury, and P. L. Rosalen. 1998. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr. Microbiol.* 36: 24-28.
27. Pooja, D., L. Tunki, H. Kulhari, B. B. Reddy, and R. Sistla. 2016. Optimization of solid lipid nanoparticles prepared by a single emulsification-solvent evaporation method. *Data Brief.* 6: 15-19.
28. Rama A., L. Lucatello, C. Benetti, G. Galina, D. Bajraktari. 2016. Assessment of antibacterial drug residues in milk for consumption in Kosovo. *J Food Drug Anal.* pii/S1021949816301247. doi: 10.1016/j.jfda.2016.07.007
29. Santana H.F, A.A.T. Barbosa, S. O. Ferreira, H. C. Mantovani. 2012. Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 485-491.
30. Santos S.S, A. Lorenzoni, N. S. Pegoraro, L. B. Denardi, S. H. Alves, S. R. Schaffazick and L. Cruz. 2014. Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 116: 270-276.
31. Schaffazick S.R, A. R. Pohlmann, L.D.L. Freitas, S. S. Guterres. 2002. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. *Acta Farm. Bonaerense.* 21: 99-106.

32. Schaffazick S.R., S. S.Guterres, L.D.L. Freitas, A. R. Pohlmann. 2003. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim Nova*. 26: 726-737.
33. Singleton V.L., J. A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.
34. Vintov J., F. M. Aarestrup, C. E. Zinn, J. E. Olsen. 2003. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. *Vet. Microbiol.* 95: 133-147.
35. Wang, K., Jin, X. L., Shen, X. G., Sun, L. P., Wu, L. M., Wei, J. Q., and Liu, J. X. 2016. Effects of Chinese Propolis in Protecting Bovine Mammary Epithelial Cells against Mastitis Pathogens-Induced Cell Damage. *Mediators of inflammation*, 2016.
36. Yongkun P., M. Ikegaki, S. M. de Alencar, F. F. de Moura. 2000. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Honeybee Science*. 21: 85-90.

DEVELOPMENT OF PROPOLIS NANOPARTICLES FOR THE TREATMENT OF BOVINE MASTITIS AND IN VITRO EVALUATION OF ANTIMICROBIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITIES

Gabriela T. B. P. Machado, * Maria B. R. Veleirinho, † Letícia Mazzarino,
* Luiz C. P. Machado Filho, † Marcelo Maraschin, * Shirley Kuhnen

*Department of Animal Sciences, Agrarian Sciences Centre, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, 88034-001

†NanoBioMat Laboratory, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, 88040-900

Corresponding author: shirley.kuhnen@ufsc.br

Address: Admar Gonzaga, 1346 - Itacorubi, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, 88034-000

Phone: 55 48 37215256

SUPPLEMENTARY MATERIAL

S1. Antimicrobial activity of NP-1, NP-2, NP-3 nanoparticles and crude extract against *S. aureus* ATCC (25923) and seven isolates of mastitic milk, evaluated by the broth microdilution method with different concentrations (39-5000 µg/mL). Figure S1 shows the difference in the reduction of the microbial activity of the different formulations, evidencing the greater biological potential of the NP-1 and NP-3 nanoparticles and the crude extract with MIC of 156 µg/mL.

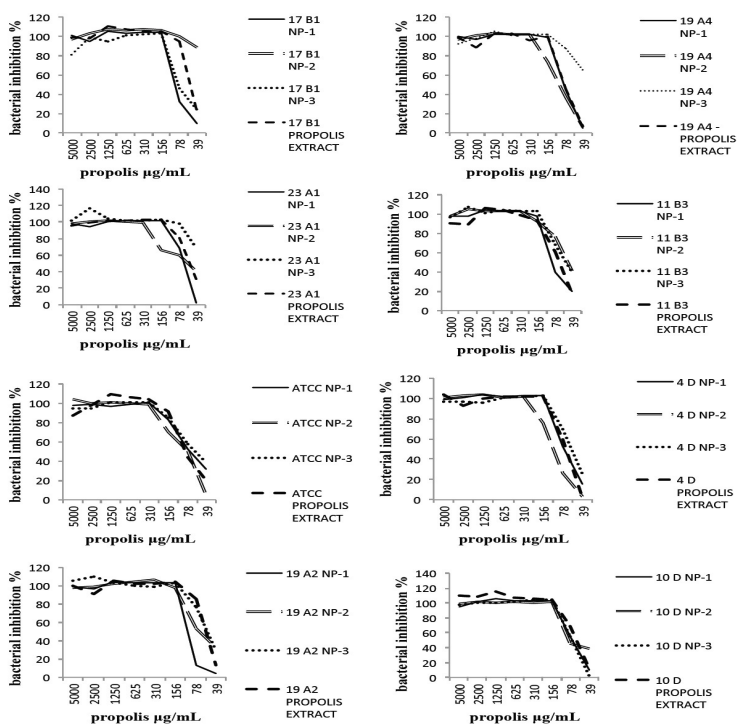


Figure S1. Antimicrobial activity of propolis nanoparticles NP-1, NP-2, NP-3 and propolis extract against *S. aureus* ATCC 25923 and 7 different isolates of mastitic milk.

S2. Cytotoxic effect of NP-1, NP-2 and NP-3 nanoparticles and their respective blank-nanoparticles on MAC-T cells. Three formulations with the same concentrations of surfactants, without propolis were considered as blank-nanoparticle. The evaluation was performed by the MTT method. Figure S2 shows that the cytotoxic effect of the formulations is due to the presence of propolis and that the blank-nanoparticles stimulated cell proliferation at the concentrations tested.

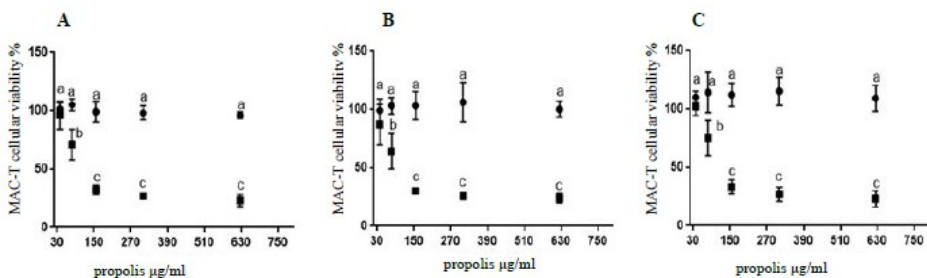


Figure S2. Cytotoxicity in MAC-T cell lines after exposure to different concentrations of propolis nanoparticles (A:NP-1, B:NP-2 and C:NP-3) represented by ■ and their respective blank-nanoparticles represented by ●. Results expressed as mean percentage of viable cells and standard deviation.

S3. Cytotoxic effect of the NP-1, NP-2, NP-3 nanoparticles and crude propolis extract and their respective blank-nanoparticles on MAC-T cells. Three formulations with the same concentrations of surfactants, without propolis were considered as blank-nanoparticle. The evaluation was performed by the MTT method. Figure S3 shows that propolis nanoparticles and crude extract reduced the viability of MAC-T cells from 78 $\mu\text{g/mL}$.

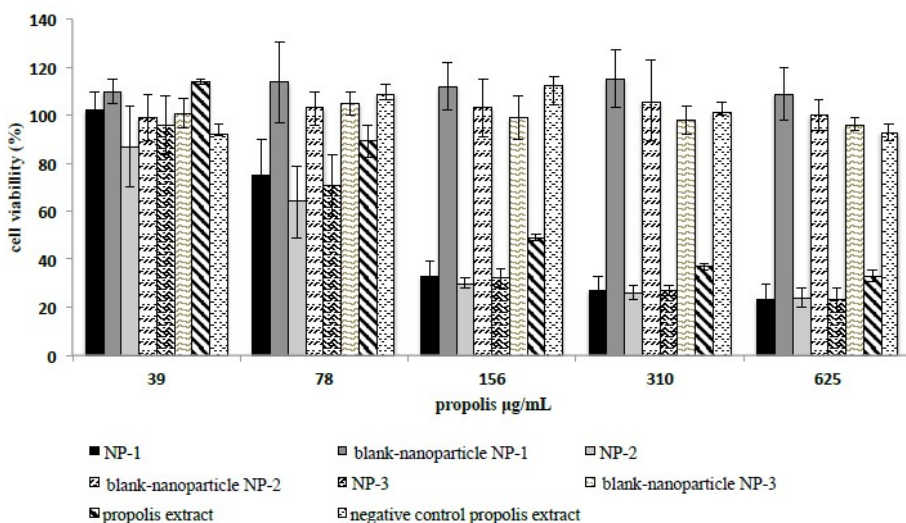


Figure 3. Cytotoxicity in MAC-T cell lines after exposure to different concentrations of propolis extract and nanoparticles NP-1, NP-2, NP-3 and their blank-nanoparticles. Results expressed as mean percentage of viable cells and standard deviation.

DISCUSSÃO GERAL

A própolis, substância natural amplamente utilizada na medicina humana e, mais recentemente, na medicina animal, possui diversas atividades biológicas comprovadas, com destaque para o potencial antimicrobiano. Entretanto, seu caráter hidrofóbico limita o seu uso e aplicação. Nesse contexto, foi proposta a associação da própolis à nanotecnologia para o desenvolvimento de formulações nanoparticuladas com potencial antimicrobiano, como alternativa ao tradicional manejo terapêutico da mastite bovina. A baixa taxa de cura de mastite causada por *S. aureus*, associada à elevada e crescente presença de cepas microbianas resistentes e ao aparecimento de resíduos antimicrobianos no leite, estimularam a realização do presente estudo. A própolis nanoparticulada foi proposta como estratégia para o desenvolvimento de sistemas aquosos estáveis, capazes de proporcionar uma possível aplicação intramamária, visando o controle da mastite bovina. A fim de otimizar as características físico-químicas das nanopartículas de própolis, foram realizados vários estudos de desenvolvimento de suspensões de nanopartículas de própolis que não mantiveram-se estáveis (Tabelas MS1 e MS2 material suplementar). Dezessete tentativas de desenvolvimento de nanopartículas foram realizadas. Destas, três formulações mantiveram-se estáveis e foram selecionadas para a realização dos demais ensaios *in vitro*.

As três suspensões de nanopartículas de própolis foram desenvolvidas com sucesso pela técnica de difusão do solvente a quente e mantiveram-se estáveis à temperatura ambiente por um período de tempo de 150 dias. As suspensões de nanopartículas estudadas mostraram que diferenças na quantidade de surfactantes na sua composição podem resultar em respostas biológicas variáveis. As suspensões de nanopartículas de própolis desenvolvidas mostraram elevada atividade antimicrobiana contra *S. aureus* com MIC de 156 e 310 µg/mL. Entretanto, as nanopartículas mostraram-se tóxicas às células do úbere bovino a partir da concentração de 78 µg/mL. Apesar da redução da viabilidade celular da linhagem MAC-T apresentada pelas nanopartículas de própolis, este fato pode contribuir para um efetivo controle da mastite bovina causada por *S. aureus*, já que a

difficuldade do seu controle está relacionada à capacidade de sobrevivência intracelular após fagocitose e ainda multiplicação dentro das células. É importante destacar também, que a avaliação da citotoxicidade utilizando cultura de células MAC-T é baseada em um teste *in vitro* que, apesar de apresentar interesse como modelo de estudo de experimentação animal, a extrapolação de doses para modelo *in vivo* é limitada. Isto porque, *in vivo*, diversos fatores contribuem para o estabelecimento de doses e limites de toxicidade, tais como a presença de diversos tipos celulares e componentes extracelulares no tecido local, a vascularização e capacidade de difusão dos compostos, a presença de células inflamatórias, entre outros. Assim, apesar dos sistemas nanoestruturados de própolis serem promissores à veiculação intramamária, estudos complementares *in vivo* são necessários para comprovação de segurança e eficácia. Sugere-se, portanto, a avaliação *in vivo* das suspensões de nanopartículas desenvolvidas, assim como a associação destas a novos veículos, a exemplo dos hidrogéis, capazes de proporcionar um maior tempo de contato para a liberação prolongada dos ativos.

CONCLUSÃO

Nanopartículas de própolis foram desenvolvidas com sucesso pela técnica de difusão do solvente a quente, mantendo-se estáveis por considerável período de tempo. As suspensões de nanopartículas de própolis mostraram elevada atividade antimicrobiana contra *S. aureus* com MIC de 156 e 310 µg/mL. Entretanto, as suspensões de nanopartículas reduziram a viabilidade celular das células MAC-T a partir da concentração de 78 µg/mL. Os efeitos antimicrobianos e citotóxicos das suspensões de nanopartículas foram dependentes das formulações e das concentrações.

REFERÊNCIAS

AFROUZAN, Houshang et al. Evaluation of antimicrobial activity of propolis and nanopropolis against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 2, p. 421-425, 2012.

ANDREU, Gilberto L. Pardo et al. The cytotoxic effects of brown Cuban propolis depend on the nemorosone content and may be mediated by mitochondrial uncoupling. **Chemico-biological interactions**, v. 228, p. 28-34, 2015.

BALCÃO, Lucas F. et al. Characterisation of smallholding dairy farms in southern Brazil. **Animal Production Science**, v. 57, n. 4, p. 735-745, 2017.

BANKOVA, Vassya S.; DE CASTRO, Solange L.; MARCUCCI, Maria C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-15, 2000.

BLOWEY, Roger; EDMONDSON, Peter. **Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche: guía ilustrada y práctica**. Acribia, 1999.

Brandão, DE M. H. (2011). U.S. Patent Application No. 13/882,043.

BRASIL 2008. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Instrução **Normativa nº 64, de 18 de dezembro de 2008**. Aprova o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. Diário Oficial da União de 19 de Dezembro de 2008, Seção 1, Página 21, Brasília, DF.

BRASIL. 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 524, de junho de 2011. **Normativa nº62 de 29 de dezembro de 2011**. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, do Leite Tipo B, do Leite Tipo C, do Leite pasteurizado e

do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil.

BUTNARIU, Monica V.; GIUCHICI, Camelia V. The use of some nanoemulsions based on aqueous propolis and lycopene extract in the skin's protective mechanisms against UVA radiation. **Journal of nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 3, 2011.

CASTALDO, Stefano; CAPASSO, Francesco. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, p. S1-S6, 2002.

CASTRO, Myrella Léssio et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, 2007.

CHINNAPPAN, Raja et al. Development of magnetic nanoparticle based calorimetric assay for the detection of bovine mastitis in cow milk. **Analytical Biochemistry**, v. 523, p. 58-64, 2017.

COSTA, G. M. et al. Population diversity of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Research in veterinary science**, v. 93, n. 2, p. 733-735, 2012.

CUNNINGHAM, J.G.; KLEIN, B.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**, 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 770 p.

DAS, M. P.; DHANABALAN, R.; DOSS, A. In vitro antibacterial activity of two medicinal plants against bovine udder isolated bacterial pathogens from dairy herds. **Ethnobotanical leaflets**, v. 2009, n. 1, p. 18, 2009.

DILSHAD, SM Raihan et al. Documentation of ethnoveterinary practices for mastitis in dairy animals in Pakistan. **Pak Vet J**, v. 30, n. 3, p. 167-171, 2010.

ERSKINE, Ronald J.; WAGNER, Sarah; DEGRAVES, Fred J. Mastitis therapy and pharmacology. **Veterinary clinics of North America: food animal practice**, v. 19, n. 1, p. 109-138, 2003.

FDA. **U.S.Food and Drug Administration**. Disponível em: <http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/Nanotechnology/default.htm>. Acesso em 16 de Junho de 2016.

FENG, Y. A. N. G. et al. Genetic characterization of antimicrobial resistance in Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis cases in Northwest China. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 12, p. 2842-2847, 2016.

FIORDALISI, Samira AL et al. The effects of Brazilian propolis on etiological agents of mastitis and the viability of bovine mammary gland explants. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 3, p. 2308-2318, 2016.

FRANDSON, Rowen D.; WILKE, W. Lee; FAILS, Anna Dee. **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. Guanabara Koogan, 2005.

FRASER, Clarence M. **Manual Merck de Veterinária**. 7ª ed. São Paulo : Roca, 1991. p. 1956 .

GONSALES, G. Z. et al. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. 276-284, 2006.

GRUET, P. et al. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. **Advanced drug delivery reviews**, v. 50, n. 3, p. 245-259, 2001.

GUIMARÃES, Juliana LB et al. Estimate of the economic impact of mastitis: A case study in a Holstein dairy herd under tropical conditions. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 142, p. 46-50, 2017.

HÉBERT, Alexandre et al. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. **FEMS microbiology letters**, v. 193, n. 1, p. 57-62, 2000.

IFAH. Annual Report 2013 International Federation for Animal Health-Europe. Disponível em: <http://www.ifaheurope.org/food-producing-animals/success-stories/bovine-mastitis.html>. Acesso em 16 de agosto de 2017.

IRACHE, Juan M. et al. Nanomedicine: novel approaches in human and veterinary therapeutics. **Veterinary parasitology**, v. 180, n. 1, p. 47-71, 2011.

KUHNEN, Shirley et al. Farm management in organic and conventional dairy production systems based on pasture in Southern Brazil and its consequences on production and milk quality. **Animals**, v. 5, n. 3, p. 479-494, 2015.

LANGONI, H.; DOMINGUESR, P. F.; FUNARIL, S. R. C. Efeito antimicrobiano in vitro da própolis. **Arq. Bras. Med**, v. 48, n. 2, p. 227-229, 1996.

LANGONI, Hélio et al. Cytological and microbiological aspects of milk in farms with an organic system of production. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 881-886, 2009.

LOGUERCIO, Andrea Pinto et al. Atividade in vitro do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 347-349, 2006.

LUSTOSA, Sarah R. et al. Propolis: updates on chemistry and pharmacology. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

MENEGHELLI, Cristiane et al. Southern Brazilian autumnal propolis shows anti-angiogenic activity: an in vitro and in vivo study. **Microvascular research**, v. 88, p. 1-11, 2013.

MUBARACK, H. Muhamed et al. Activity of some selected medicinal plant extracts against bovine mastitis pathogens. **J Anim Vet Adv**, v. 10, n. 6, p. 738-741, 2011.

MÜELLER, Rainer H.; MAÈDER, Karsten; GOHLA, Sven. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.

NETO, Santos et al. Susceptibility of Staphylococcus spp. isolated from milk of goats with mastitis to antibiotics and green propolis extracts. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 6, n. 1, p. 63-68, 2009.

NOGI, Kiyoshi et al. (Ed.). **Nanoparticle technology handbook**. Elsevier, 2012.

OLIVEIRA, L. et al. Minimum inhibitory concentrations of Staphylococcus aureus recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 4, p. 1913-1920, 2012.

OLIVER, Stephen P.; MURINDA, Shelton E. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 165-185, 2012.

PARK, Yong K. et al. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Current microbiology**, v. 36, n. 1, p. 24-28, 1998.

PARK, YongKun et al. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, v. 21, n. 2, p. 85-90, 2000.

PARK, Yong Kun et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência rural**, v. 32, n. 6, 2002.

PINTO, Marcelo Souza et al. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001.

POND, Wilson G.; BAZER, Fuller W.; ROLLIN, Bernard E. (Ed.). **Animal welfare in animal agriculture: husbandry, stewardship, and sustainability in animal production**. CRC Press, 2011.

PURI, Anu et al. Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 26, n. 6, 2009.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed Editora, 2005.

RADOSTITS, Otto M. et al. (Ed.). **Veterinary Medicine E-Book: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. Elsevier Health Sciences, 2007.

SAEKI, Erika Kushikawa et al. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 3, p. 284-290, 2011.

SANTANA, Henrique Freitas et al. Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 485-491, 2012.

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para

administração de fármacos. **Química nova. São Paulo. Vol. 26, n. 5 (2003), p. 726-737**, 2003.

SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 1, p. 1-14, 2007.

SFORCIN, José Maurício; BANKOVA, Vassya. Propolis: is there a potential for the development of new drugs?. **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

SILVA, João Carlos et al. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1790-1795, 2012.

SPINOSA, H. S.; Górnaiak, S. L.; Bernardi, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 824p.

TRONCARELLI, M. Zampoli et al. Nanotechnology and antimicrobials in veterinary medicine. **Badajoz, Spain: FORMATEX**, 2013.

VERONEZ, R. Revisão de literatura: própolis na clínica médica internacional. 2000.

VINTOV, Jan et al. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. **Veterinary microbiology**, v. 95, n. 1, p. 133-147, 2003.

WATTIAUX, M. A. Princípios da ordenha. In: Essencias em gado de leite. **University of Wisconsin-Madison: Instituto Babcock para Pesquisa e Desenvolvimento da Pecuária Leiteira Internacional**, 140p., 2011.

MARASCHIN, Marcelo et al. A Machine Learning and Chemometrics Assisted Interpretation of Spectroscopic Data—A NMR-Based

Metabolomics Platform for the Assessment of Brazilian Propolis. **Pattern Recognition in Bioinformatics**, p. 129-140, 2012.

ZHU, Hongmei et al. Bactericidal effects of Cinnamon cassia oil against bovine mastitis bacterial pathogens. **Food Control**, v. 66, p. 291-299, 2016.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Composição de diferentes suspensões de nanopartículas de própolis desenvolvidas pelo método de homogeneização por alta pressão. Tentativas de desenvolvimento (n=9).

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
Extrato seco própolis %	0,1	1	2	1	1	1	1	1	1
Lecitina de soja %	-	-	-	-	-	0,25	0,25	0,25	0,25
Poloxamer 188 %	-	-	-	-	-	1	1	1	1
Tween 80 %	2	1	4	4	4	-	-	-	-
TCM – Miglyol 812 N %	-	5	-	-	2,5	-	5	-	5
Água %	q.s100	q.s 100	q.s100	q.s100	q.s100	q.s100	q.s100	q.s100	q.s100
Etanol P.A %	-	-	5	5	2,5	-	-	5	-

Tabela S2. Composição de diferentes suspensões de nanopartículas de própolis desenvolvidas pelo método de difusão do solvente a quente. Tentativas de desenvolvimento (n=8).

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Extrato seco própolis %	1	5	7	2	4	1	3	2
Lecitina de soja %	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,75	0,50
Poloxamer 188 %	1	1	1	1	1	1	3	2
Água %	q.s100	q.s100	q.s100	q.s100	q.s100	q.s100	q.s100	q.s100
Etanol P.A %	5	10	10	5	5	8	8	8