

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JOÃO FRANCISCO LUCON JUNIOR

**Avaliação da atividade microbica de extratos vegetais sobre  
*Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina**

Pirassununga

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos  
da Universidade de São Paulo

Lucon Junior, João Francisco

L941a      Avaliação da atividade microbicida de extratos vegetais  
sobre *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina /  
João Francisco Lucon Junior. -- Pirassununga, 2013.

42 f.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e  
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.

Departamento de Ciências Básicas.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Edson Roberto da Silva.

1. Extratos vegetais 2. Mastite bovina 3. Medicina  
popular 4. *Staphylococcus aureus* I. Título.

# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JOÃO FRANCISCO LUCON JUNIOR

**Avaliação da atividade microbicida de extratos vegetais sobre  
*Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina**

**Versão corrigida**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia  
e Engenharia de Alimentos da Universidade de  
São Paulo para obtenção de Título de Mestre

Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Edson Roberto da Silva

Pirassununga

2013

Aos meus pais João Francisco e Maria do Carmo  
pelo amor, dedicação, apoio e incentivo  
em todos os momentos de nossa caminhada.

Ao meu irmão Lucas Gustavo pela luta, força de vontade ao  
superar todas as adversidades enfrentadas.

Aos meus avós Maria Conceição, Paulo Alonso, Maria  
Cecília pelo carinho e exemplo de perseverança e dignidade.

As minhas tias Regina, Rachel, Isa e Vera pelo carinho,  
compreensão e apoio em todos os momentos.

A minha companheira Patrícia de Araújo  
Tonetti pelo amor, paciência, carinho, dedicação em  
todos os momentos que passamos juntos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao professor Edson Roberto da Silva, pela constante atenção, apoio, e orientação durante o trabalho de elaboração dessa dissertação.

Aos professores Ricardo Moro de Sousa e Andrezza Maria Fernandes pela amizade e orientação na elaboração dos trabalhos microbiológicos.

Aos técnicos Flávia Munin e Antonio Marcio Scatolini pela valiosa amizade, incentivo e carinho.

Agradeço à professora Prislaine Pupolin Magalhães pela amizade e incentivo, desde o momento em que esta etapa era apenas uma vontade.

Agradeço ao amigo e professor Romualdo Lucchesi pela amizade e discussões interessantes que contribuíram para meu crescimento pessoal.

Agradeço ao amigo Gustavo Gimenez Parra pelo apoio e pela amizade.

Aos colegas do laboratório por dividirmos e somarmos esforços na conquista de mais uma etapa de vida.

À toda a equipe da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo pela colaboração prestada.

## Resumo

LUCON JUNIOR, J.F. **Avaliação da atividade microbicida de extratos vegetais sobre *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina.** 2013. 45p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

A resistência bacteriana é responsável perante o fracasso no tratamento de infecções com agentes quimioterápicos. São necessárias novas alternativas para controlar estes micro-organismos. Entre essas alternativas estão plantas utilizadas tradicionalmente na medicina popular. O presente trabalho avaliou a eficiência dos extratos etanólicos e acetonícos de folhas de *Cecropia pachystachya* e *Curatella americana* com atividade antibacteriana *in vitro* em cepas de *Staphylococcus aureus* isolado de caso de mastite bovina. Os extratos de *C. pachystachya* e *C. americana* apresentam MIC de 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>. O composto isolado de *C. pachystachya* denominado EEB2 apresentou actividade bactericida para uma concentração de 1,25 mg.mL<sup>-1</sup>. Estes resultados demonstram que os extratos de *C. pachystachya* e *C. americana* contém compostos anti-bacterianos.

Palavras-chave: extratos vegetais, mastite bovina, medicina popular, *Staphylococcus aureus*.

## Abstract

LUCON JUNIOR, J.F. **Evaluation of antibacterial activity of plant extracts on *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis.** 2013. 45p. M.Sc. Dissertation - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Bacterial drug resistance is responsible for the failure of the treatment of infection using chemotherapeutic agents. Thus, new approaches are necessary for the control of these microorganisms. Included among these alternatives are several plants that are traditionally used in folk medicine. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of the ethanolic and acetone extracts of leaves of *Cecropia pachystachya* and *Curatela americana* *in vitro* against *S. aureus* bacteria isolates from cases of bovine mastitis. The extracts from *C. pachystachya* and *Curatela americana* had a MIC of 2.5 mg.mL<sup>-1</sup>. The compound isolated from *C. pachystachya* called EEB2 showed bactericidal activity at a concentration of 1.25 mg.mL<sup>-1</sup>. These results demonstrate that the extracts of *C. pachystachya* and *C. americana* contains antibacterial compounds.

Keywords: plant extracts, bovine mastitis, folk medicine, *Staphylococcus aureus*.

## Lista de figuras

Figura 1 - Extração de compostos a partir da droga vegetal pulverizada.....	22
Figura 2 - Fracionamento do extrato acetônico de embaúba.....	23
Figura 3 - Cromatografia em camada delgada dos extratos de <i>C. pachystachya</i> (canaletas 2 e 4) e <i>C. americana</i> (canaletas 1 e 3) após extração em fase sólida utilizando cartucho C18. A- sem revelação B- revelação NP/PEG visualizada em 365 nm.....	32
Figura 4 - Análise de EEB1 e EEB2 por HPLC-DAD (280 nm).....	33



## Lista de tabelas

Tabela 1 - Rendimento da extração.....	28
Tabela 2 - Rendimento do fracionamento do extrato acetônico.....	28
Tabela 3 - Quantidade de compostos fenólicos e flavonóides.....	31
Tabela 4 - Fator de retenção ( $R_f$ ) e rendimento.....	32

## Sumário

Lista de figuras.....	7
Lista de tabelas.....	8
1. Introdução.....	10
2. Literatura.....	11
2.1. Mastite bovina.....	11
2.2. Plantas com atividade antibacteriana.....	15
2.3. <i>Curatella americana</i> .....	18
2.4. <i>Cecropia pachystachya</i> .....	18
3. Objetivo.....	20
4. Materiais e métodos.....	21
4.1. Preparo dos extratos.....	21
4.3. Fracionamento em C18.....	24
4.4. Separação e purificação.....	24
4.5. Inóculo.....	25
4.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	25
4.7. Determinação de concentração inibitória mínima (CIM).....	25
4.8. Método de diluição em caldo.....	26
4.9. Determinação de compostos fenólicos.....	26
4.10. Determinação de flavonoides.....	27
5. Resultados e discussão.....	28
5.1. Rendimento dos extratos.....	28
5.2. Determinação de compostos fenólicos e flavonoides.....	29
5.3. Separação e purificação.....	31
5.4. Determinação do CIM em isolado de <i>S. aureus</i> .....	34
6. Conclusões.....	35
7. Perspectivas.....	36
8. Referências.....	37

## 1. Introdução

A mastite bovina é uma doença bastante comum na pecuária leiteira em todo o mundo e é responsável pelo maior impacto econômico em bovinos de leite por danos aos produtores e à indústria de laticínios (TOZZETTI *et al.*, 2008).

O estresse e as lesões físicas podem causar a inflamação da glândula mamária. No entanto, a infecção invasiva por bactérias e outros micro-organismos, tais como bolores e leveduras são os principais responsáveis pela ocorrência da doença (COSTA, 1998). A mastite causa grandes prejuízos financeiros para a indústria, não só com a eliminação e a redução na produção de leite, mas também com o descarte precoce dos animais. Programas de saúde animal recomendam o uso de desinfetantes e anti-sépticos para evitar a ocorrência e propagação de micro-organismos e uso de antibióticos é recomendado apenas em casos graves (AVANCINI *et al.*, 2008).

O uso de plantas medicinais na medicina popular tem mostrado que caule, raízes, folhas, sementes e frutos de plantas têm eficiência na cura de várias doenças, despertando assim grande interesse no estudo científico das mesmas (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005).

Os produtos naturais têm um papel importante na descoberta de drogas e tornam-se uma fonte importante para a obtenção de compostos bioativos (BERGMANN *et al.*, 1997).

O presente trabalho aborda a atividade antibacteriana de extratos vegetais, frações e compostos obtidos a partir de folhas de *Cecropia pachystachya* e *Curatella americana* sobre cepas de *Staphylococcus aureus* isolada de mastite bovina e também objetiva determinar a concentração inibitória mínima dos extratos, frações e compostos obtidos.

## 2. Literatura

### 2.1. Mastite bovina

Mastite, ou inflamação da glândula mamária, é uma doença bastante comum e a mais onerosa aos criadores de gado leiteiro em todo o mundo. O estresse e ferimentos físicos também causam a inflamação da glândula mamária, entretanto a infecção por bactérias invasivas e outros micro-organismos como fungos, são os principais agentes causadores da mastite bovina (TOZZETTI *et al.*, 2008).

Em 90% dos casos de mastite os micro-organismos responsáveis pela patologia são bactérias. Bolores, leveduras, algas e vírus também podem estar envolvidos na etiologia da doença, entretanto com menor ocorrência (PHILPOT; NICKERSON, 1991).

A doença é uma das mais complexas e dispendiosas na pecuária leiteira, em decorrência da sua prevalência e das perdas que acarreta (COSTA, 1998). O efeito da mastite bovina é notado, predominantemente, pela redução na produção e nas alterações causadas na composição do leite. Outro aspecto relevante são os riscos à saúde pública em virtude da eliminação de agentes causadores de zoonoses e toxinas produzidas pelos micro-organismos. No que refere-se ao produtor, o descarte de animais e o desprezo do leite contaminado (SIMÕES; OLIVEIRA, 2012).

A mastite é a doença que mais provoca perdas econômicas na cadeia produtiva do leite (RADOSTITS *et. al*, 2002) e, tentar minimizar as perdas pela patologia, requer um controle rigoroso da higiene da glandula mamária, boas práticas na ordenha e um eficiente programa de sanidade animal. Causam redução na produção de leite, chegando a alguns casos na perda de um ou mais quartos (TOZZETTI *et al.*, 2008).

Na forma clínica o animal apresenta sinais perceptíveis da doença, tais como dor, edema, endurecimento e temperatura elevada da glândula mamária. Além disso, há o aparecimento de pus, grumos e outras alterações nas características físicas do leite. O quadro pode apresentar outras manifestações

como febre, diminuição na produção do leite e redução do consumo de alimentos (SIMÕES; OLIVEIRA, 2012).

Os casos de mastite clínica podem ser diagnosticados a partir de sintomas clínicos como dor, recusa à ordenha e leite com sangue (RADOSTITS *et al.*, 2002). Outras alterações também devem ser consideradas como o aumento da contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT), aumento dos teores de cloreto, sódio, proteínas séricas e diminuição do percentual de caseína, gordura e lactose do leite (TOZZETTI *et al.*, 2008), entretanto são necessários exames para caracterizar essas alterações.

O tipo subclínico não apresenta sinais clínicos da doença e pode ser detectada pela contagem direta ou indireta de células somáticas no leite. Estas são compostas por células de descamação do epitélio secretor e leucócitos de origem sanguínea, sendo que estas se apresentam com altas concentrações quando existe a doença (TOZZETTI *et al.*, 2008).

No caso destes métodos que têm os leucócitos como elemento principal nas suas determinações, a idade da vaca, estágio de lactação, ordem do parto podem influenciar nos resultados. Entretanto o estágio da infecção é o principal responsável pela variação da contagem de células somáticas (HARMON, 1994; MACHADO, DEMETRIO, BORGES, 2003).

A contagem de células somáticas em um rebanho controlado se mantém constante e abaixo de 100.000 células por mL de leite (TOZZETTI *et al.*, 2008).

O perfil subclínico da mastite não apresenta alterações aparentes na glandula mamária e no leite, mas ocorrem mudanças na composição do produto como aumento de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) e a diminuição da concentração de caseína, gordura, sólidos totais e lactose do leite (BRITO *et al.*, 2007).

A mastite crônica se caracteriza por infecção perseverante do úbere, que pode durar dias, meses ou anos, apresentar sinais de fibrose dos quartos atacados, em alguns casos acompanhados de atrofia do mesmo e presença de fístulas (HILLERTON, 1996).

Na mastite gangrenosa, o quarto mamário afetado apresenta-se com temperatura reduzida, de cor anormal, variando do escuro ao púrpuro-azulado. O quarto atingido pode apresentar-se molhado e com gotejamento contínuo de soro tingido de sangue (BLOWEY; EDMONSON, 1999).

A mastite bovina secundária, também chamada de mastite ambiental, acontece a partir da transferência das bactérias do ambiente para a glândula mamária. Essa transferência acontece entre ordenhas, entretanto a migração dessas bactérias de um teto a outro não está descartada (BRITO *et al.*, 2007).

Considerando que os agentes causadores da mastite secundárias estão presentes no ambiente, todos os animais expostos estão susceptíveis. Na maioria dos casos de mastite ambiental o período de duração da infecção é curto, e por esse motivo tem maior predisposição para evoluir para um quadro clínico. As infecções por estreptococos presentes no ambiente apresentam tempo de duração inferior a 30 dias e seu predomínio fortuitamente ultrapassa 10 a 15% do total de quartos do rebanho (SMITH; HOGAN, 2008; BOTARO; SANTOS, 2008).

A mastite bovina é causada por micro-organismos bastante adaptados para sobreviver no úbere e esses são transportados de um quarto contaminado a outro saudável no processo de ordenha através da mão do ordenhador ou das teteiras da ordenhadeira (BRITO *et al.*, 2007).

Os principais micro-organismos infecciosos são *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, e *Corynebacterium bovis* (SILVA; ARAÚJO, 2008) e são responsáveis por aproximadamente 90 a 95% das infecções intramamárias dos rebanhos leiteiros (CREMONESI *et al.*, 2005). Esses micro-organismos acometem a glândula mamária e causam uma resposta inflamatória que apresenta diversos sintomas. Algumas bactérias que causam mastite bovina podem produzir substâncias tóxicas resistentes à temperatura, o que representa um risco relevante à saúde humana (BRAMLEY *et al.*, 1999).

Os estafilococos são importantes patógenos causadores de mastites em rebanhos leiteiros, entre eles o *S. aureus*. Também são importantes porque apresentam resistência ao tratamento e a propensão a recorrência mesmo quando tratados com antibióticos (BOUCHARD *et al.*, 2013).

Em estudo realizado no Brasil, *S. aureus* isolados de mastite bovina foram tratados com amoxicilina, estreptomina, tetraciclina e lincomicina. Os resultados mostram que existe resistência para os beta-lactâmicos, como as penicilinas e as cefalosporinas, devido a utilização de drogas antimicrobianas sem controle veterinário (FRANCA *et al.*, 2012).

São micro-organismos facilmente encontrados na natureza e estão presentes na microbiota normal da pele e da mucosa. O gênero *Staphylococcus* apresenta 27 espécies, algumas são causadores de doenças oportunistas em animais e humanos como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus* (TRABULSI *et al.*, 1999).

As infecções causadas por estafilococos são tratadas com penicilina para cepas sensíveis, entretanto o surgimento de linhagens resistentes, devido a produção de enzimas denominadas penicilinases e bectalactamases, o uso desse fármaco tornou-se limitado. A utilização de maneira indiscriminada e sem orientação de penicilinas no tratamento de infecções causadas por bactérias levou a confirmação que algumas doenças causadas por esses micro-organismos não eram mais sensíveis ao seu uso e ficou evidenciado que micro-organismos anteriormente susceptíveis estavam tornando-se resistentes (LIMA, 2001).

O uso de antibióticos no tratamento da mastite é uma preocupação constante para a indústria de alimentos, devido aos resíduos originados no tratamento da doença, porque interferem nos processos industriais que têm como matéria prima o leite. Os resíduos de antibióticos presentes no leite de consumo também representam riscos à saúde pública, e por esse motivo o Governo Federal, por intermédio da Portaria nº 56 de 1999 (BRASIL, 1999), estabelece que os níveis permitidos para resíduos de fármacos equivalentes a antibióticos presentes no leite. Na ordenha, a manutenção constante dos equipamentos, a higienização do úbere e dos equipamentos, a boa nutrição das vacas são recomendações para a prevenção da mastite no rebanho. O manejo adequado tem como objetivo a redução da infecção do rebanho, pois a incidência de mastite diminui quando velocidade de aparecimento de novas infecções é menor (RADOSTITS *et al.*, 2002).

A redução na produção de leite em decorrência da mastite pode ser dividida em dois períodos diferentes: o primeiro período, considerado etapa aguda, acontece em um curto período de tempo durante a produção de leite logo após a aparição dos sinais e sucessiva recuperação, com prevalência de até seis dias e redução da produtividade podendo chegar a aproximadamente 30% nesse período (BARTLETT *et al.* 1991). Terminada essa etapa, a segunda fase tem início e o período de duração é de aproximadamente 60 dias na qual

a produção apresenta-se abaixo da normalidade, podendo perseverar até o final da lactação (HORTET; SEEGERS,1998).

Estimativas também podem ser realizadas, em relação à redução da produção, considerando a contagem de células somáticas. De maneira geral, para vacas de segunda lactação em diante, à medida que a contagem de células somáticas duplica, ocorre uma redução de 0,6 kg de leite por dia, ou seja, aproximadamente 180 kg por lactação (BRITO; ARCURI; BRITO, 2000).

Os prejuízos são referentes à: 70% em decorrência da diminuição na produção por mastite subclínica; 14% por desvalorização dos animais devido a redução da função dos quartos afetados, descarte prematuro do animal ou óbito, 8% pelos custos com tratamentos, remuneração de veterinários e despesas com medicamento (PERES; NETO, ZAPPA, 2011).

## 2.2. Plantas com atividade antibacteriana

A utilização de compostos químicos de origem vegetal é uma prática que acontece desde os primórdios da humanidade, mas somente obteve caráter científico e técnico com a evolução da alquimia no século XVI. Em um primeiro momento foram avaliados fenóis, cresóis, formol e outros compostos, os quais apresentavam-se eficientes como antibacterianos. Entretanto, esses compostos não agiam de forma seletiva atuando somente sobre os micro-organismos, mas também provocavam danos às células hospedeiras. O desenvolvimento de pesquisas planejadas produziu informações sobre doses adequadas para os micro-organismos, sem causar danos para as células hospedeiras (Trabulsi *et al.*, 1999).

O uso do quinino, oriundo das folhas das árvores de chinchon, pelos peruanos, apresentou atividade no tratamento da malária. Compostos extraídos de bolores apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica e foram utilizados no tratamento de doenças pelos chineses. Compostos isolados de vegetais como a emetina utilizada no tratamento de amebíase, e a ipecacuanha no tratamento de diarréias datam de 1000 antes de Cristo. (TAVARES, 1984; NIERO *et al.*, 2000).



A utilização de plantas medicinais desde os primórdios está presente na cultura de todos os povos, e esse conhecimento popular demonstra a importância do estudo de caule, raízes, folhas, sementes e frutos de plantas que apresentam eficiência na cura de diversas moléstias e por esse motivo existe grande interesse no estudo científico dessas plantas (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005).

Os primeiros trabalhos que avaliaram a atividade antimicrobiana de plantas foram iniciados na década de 40. No ano de 1943, Osborn avaliou o potencial antimicrobiano de 2300 plantas superiores em *S. aureus* e *Escherichia coli*, onde 63 gêneros apresentavam compostos com capacidade inibitória. Em 1994 vários estudos confirmaram o potencial antimicrobiano de extratos de plantas sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas (PEDERSON, FISHER 1984).

As pesquisas sobre compostos com potencial antimicrobiano de origem vegetal no Brasil tiveram início com Cardoso e Santos (1948). Foram avaliados extratos de 100 diferentes espécies vegetais, onde apenas cinco extratos apresentaram atividade inibitória à *S. aureus*, *E. coli* e *Proteus* X19.

Em 1950 os primeiros compostos de espécies vegetais foram isolados: diterpeno, biflorinina e o triterpeno maitenina. Entretanto, outros compostos como flavonóides com propriedades antimicrobianas contra *S. aureus* resistentes a metilina foram isolados, como a miconidina e aprimina (XU; LEE, 2001).

Fica evidente que os produtos naturais possuem um papel importante na descoberta de fármacos desde o início do século XX. Em 1990, as plantas tornaram-se uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos; 25% dos medicamentos do mercado farmacêutico possuem extratos em sua composição, alguns dos quais têm sido usados como matéria-prima de fármacos semi-sintéticos (BERGMANN *et al.*, 1997). No período de 1981 a 2002, 61% das moléculas descobertas e em processo de desenvolvimento são produtos naturais ou tiveram suas origens em produtos naturais (NEWMAN *et al.*, 2003), além disso, a avaliação científica de plantas medicinais usadas popularmente contribuiu, no passado, e continua contribuindo com a medicina moderna com muitos fármacos efetivos no tratamento das mais diversas doenças.

O Neem (*Azadiracta indica*), originário do Sudeste da Ásia, região de clima tropical, pertence à família *Meliaceae*, sendo cultivado em todos os países da África, na Austrália e América Latina foi introduzido no Brasil em 1993, possui diversas aplicações, em especial como antisséptico, curativo e vermífugo. Entre a sua ampla utilização, possui particularidade de atuar como acaricida, fungicida e nematocida (BENOIT-VICAL *et al.*, 2003). Além dessas propriedades, o óleo extraído do fruto do Neem apresenta atividade antibacteriana, inclusive *S. aureus* (MANCIBO *et al.*, 2002).

O gênero *Kielmeyera* é encontrado na América do Sul com maior frequência nos cerrados brasileiros. Plantas do gênero *Kielmeyera* têm sido usadas pela população para o tratamento de diversas doenças, como esquistossomose, leishmanose, malária, infecção por bactérias e fungos, entre outras (DE TOLEDO *et al.*, 2011).

Os estudos com espécies do gênero *Kielmeyera* demonstraram uma maior frequência de algumas classes de substâncias químicas, dentre elas estão as 4-alquil e 4-fenilcumarinas (neoflavonóides) e as xantonas, sendo as xantonas o metabólito secundário mais largamente encontrado no mesmo (CRUZ, SILVA-NETO, GUEDES, 2001; CRUZ *et al.*, 2002). Substâncias isoladas de espécies do gênero foram submetidas a ensaios biológicos e algumas destas apresentaram atividade antimicrobiana (CORTEZ *et al.*, 1998), antioxidante (IINUMA *et al.*, 1996) e antitumoral (DALL'ACQUA *et al.*, 2002).

Extratos etanólicos das folhas de *Combretum molle* apresentaram atividade antibacteriana para *S. aureus* e *S. agalactiae* isolados de casos clínicos de mastite bovina utilizando o método de difusão em disco de ágar em concentrações de 3 mg/mL, enquanto os extratos etanólicos de caule e sementes não apresentaram inibição no desenvolvimento dos microorganismos (REGASSA; ARAYA, 2012).

A utilização de plantas na etnoveterinária na prevenção e controle da mastite é bastante frequente. Espécies como *Alternanthera brasiliana*, *Foeniculum vulgare* Mill, *Aloe arborescens* Mill, *Achillea millefolium*, *Baccharis trimera*, *Solidago chilensis* Meyer, *Symphythum officinale*, *Sambucus nigra*, *Chenopodium ambrosioides*, *Mentha* sp., *Ocimum basilicum*, *Parapiptadenia rigida*, *Allium sativum*, *Cuphea carthagenensis*, *Sida rhombifolia*, *Phytolacca dioica* e *Solanum mauritianum* são exemplos de plantas utilizadas no

tratamento de mastite bovina. Testes *in vitro* mostraram que extratos de *Alternanthera brasiliana*, *Achillea millefolium* e *Baccharis trimera* apresentaram atividade antibacteriana para *S. aureus* (AVANCINI *et al.*, 2008). Sendo assim, a observação das propriedades terapêuticas de produtos naturais tem levado à pesquisa dos princípios ativos de várias espécies vegetais.

### 2.3. *Curatella americana*

A planta *Curatella americana* é um arbusto nativo da Austrália e das Américas tropicais. É conhecida popularmente como lixeira, sambaíba, cajueiro-bravo, caimbé, aderno, cambarba ou marajoara. Sua infusão é usada em medicina popular para o tratamento de úlceras (VOSS, 1983). A análise fitoquímica desta espécie tem demonstrado a presença de compostos como flavonóides, terpenos, compostos fenólicos, saponinas e esteróides (ELAZIZI *et al.*, 1980). Foi demonstrado que alguns dos componentes presentes na planta tem ação anti-inflamatória (LIU, 1995).

O extrato etanólico obtido com cachaça brasileira de folhas de *C. americana* mostrou atividade antifúngica, sendo que os melhores resultados foram obtidos quando se usou extrato bruto (DE TOLEDO *et al.*, 2011). O extrato etanólico da casca apresenta efeito gastroprotetor e ação curativa devido a modulação dos níveis de somatostatina e gastrina, provavelmente devido à presença de proantocianidinas na casca (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2009).

O extrato hidroalcoólico da casca de *C. americana* possui atividade analgésica e anti-inflamatória quando administrado a ratos por via intraperitoneal (ALEXANDRE-MOREIRA *et al.*, 1999).

### 2.4. *Cecropia pachystachya*

A *Cecropia pachystachya*, também chamada popularmente de embaúba, umbaúba, imbaúba, embaúva, umbaúba-do-brejo, árvore-da-preguiça, umbaubeira, pau-de-lixia, árvore-da-preguiça, entre outras, é característica de solos de maior umidade, típica da borda de matas, clareiras grandes e de estradas e tem preferência pelos locais ensolarados, sendo rara sua presença

no interior de matas fechadas. Floresce de setembro a outubro e frutifica de maio a junho. O desenvolvimento das plantas no campo é rápido (HIKAWCZUK *et al.*, 1998).

Os principais compostos identificados em sua casca são a geranilacetona, ácido láurico, ácido palmítico, octadecanal e alcanos de cadeia longa; nas raízes: geranilacetona, farnesol, farnesilacetona, ácido palmítico, octadecanal e alcanos de cadeia longa; e no tronco: geranilacetona, ácido palmítico e alcanos de cadeia longa (HERNANDEZ-TERRONES *et al.*, 2007).

As folhas possuem atividade contra a tosse e problemas no coração (CONSOLINI *et al.*, 2006) e segundo a medicina popular são apresentadas como agentes antiasmáticos e expectorantes (SORANU; BANDONI, 1978; ARAGÃO *et al.*, 2010). Estudos demonstraram que os compostos presentes nos extratos das folhas de embaúba possuem efeitos hipoglicemiantes (LORENZI; MATOS, 2002) e antioxidantes (ARAGÃO *et al.*, 2010).

Extratos etanólicos de cascas, raízes e folhas de *C. pachystachia* apresentaram atividade antimalárica. O fracionamento dos extratos etanólicos resultaram na caracterização do composto ácido turmenico responsável pela inibição do crescimento do parasita. Os extratos foram mantidos refrigerados durante 7 anos e a atividade antimalárica permaneceu inalterada (UCHOA *et al.*, 2010).

O extrato de diclorometano de folhas de embaúba inibiu a viabilidade de neutrófilos humanos por meio de apoptose. Sendo assim, é provável que as substâncias presentes nesse extrato sejam capazes de limitar a resposta inflamatória por perda de função celular (SCHINELLA *et al.*, 2008).

A embaúba é amplamente utilizada na medicina popular brasileira para tratar a hipertensão. O extrato etanólico de *C. pachystachya* foi testado em *Leishmania amazonensis in vitro* e os compostos bioativos presentes diminuem o crescimento do parasita alterando o K-DNA mitocondrial e inibindo a enzima arginase (CRUZ *et al.*, 2013).

### **3. Objetivo**

Avaliar a atividade antibacteriana e concentração inibitória mínima de extratos vegetais, frações e compostos obtidos a partir de folhas de *Cecropia pachystachya* e *Curatella americana* sobre cepas de *Staphylococcus aureus* isolada de mastite bovina.

## 4. Materiais e métodos

### 4.1. Preparo dos extratos

A metodologia utilizada no preparo dos extratos foi adaptada segundo Toledo (2011) onde utilizou cachaça como solvente no preparo dos extratos de plantas encontradas no cerrado brasileiro.

As folhas de *C. pachystachya* foram coletadas na cidade de Ribeirão Preto/SP e *C. americana* coletadas na cidade de Tambaú/SP. As folhas foram lavadas em água corrente e depois rinsadas com água destilada. O material foi seco a temperatura ambiente seguido de secagem em estufa a 42°C até massa constante. O material seco foi pulverizado em moinho tipo Wyllie. Os solventes utilizados para obtenção dos extratos brutos foram acetona e etanol porque esses solventes possibilitam a extração de uma maior variedade de compostos.

A extração utilizando acetona e água (7:3) e etanol (100%) foi realizada misturando a droga vegetal em pó com solvente. A mistura permaneceu em repouso durante 48 horas à temperatura ambiente. Os extratos foram filtrados e o solvente extraído a 45°C a pressão reduzida ( $p \leq 600$  mmHg).

Aos extratos foram adicionados 350 mL de água destilada durante o período de extração do solvente orgânico. As suspensões obtidas após a extração do solvente orgânico foram fracionadas e centrifugadas a 4500 xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi reservado e o precipitado descartado.

Os extratos foram submetidos a uma extração de lipídeos utilizando 300 mL de hexano adicionados sucessivamente em frações de 100 mL, em funil de separação. A fase aquosa obtida foi submetida a rotoevaporação para remoção de traços de hexano a 45°C sob pressão reduzida e adição de 300 mL de água. A solução obtida foi congelada em tubos plásticos de 50 mL utilizando nitrogênio líquido e liofilizado.

De maneira geral, a extração de compostos para ambas espécies vegetais está apresentada na figura 1.

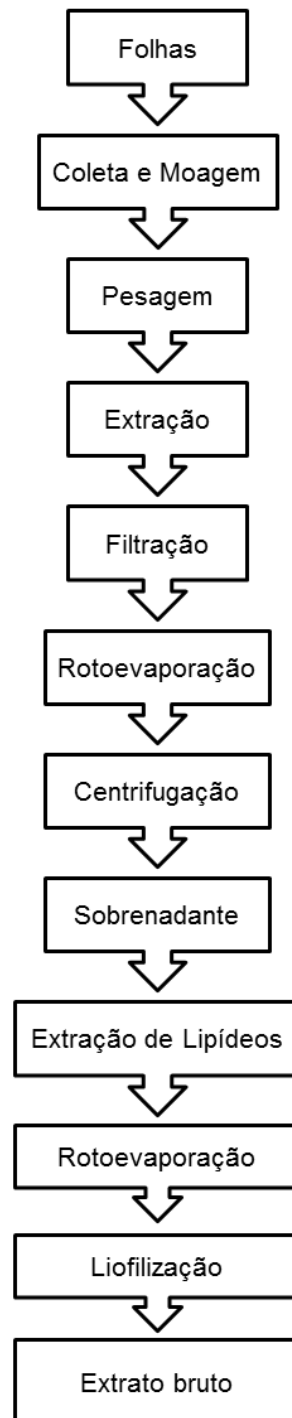


Figura 1 – Extração de compostos a partir da droga vegetal pulverizada.

#### 4.2. Fracionamento com butanol

O extrato acetônico de embaúba foi submetido a um processo de partição líquido-líquido, com butanol, objetivando separação de substâncias através de sua diferença de polaridade.

Um grama de extrato acetônico obtido após liofilização foi dissolvido em 200 mL de água e após total solubilização do extrato foi adicionado 300 mL de butanol em frações de 100 mL, em funil de separação. Ambas as fases, butanólica (EA-Buf) e aquosa (EA-Af) obtidas foram submetidas a rotoevaporação para remoção do butanol a 60°C sob pressão reduzida ( $p \leq 600$  mmHg) e adição de 200 mL de água.

As frações obtidas após a extração do butanol, EA-Buf e a EA-Af, foram congeladas em tubos plásticos de 50 mL utilizando nitrogênio líquido e posteriormente liofilizadas. A representação gráfica do fracionamento do extrato acetônico com butanol está representado na figura 2.

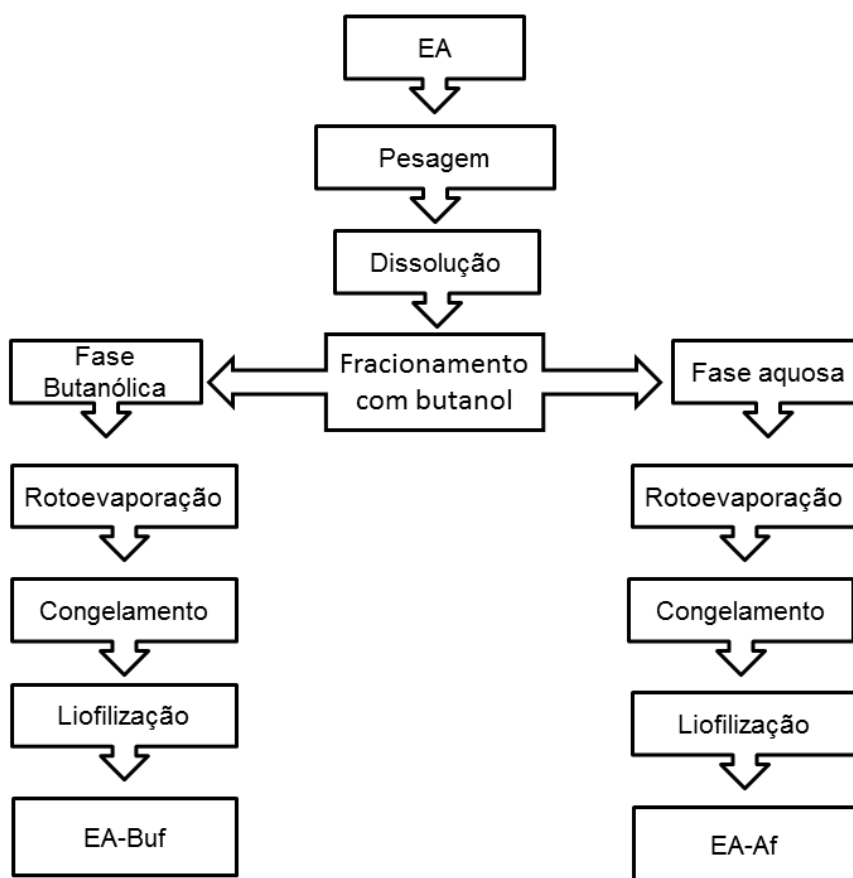


Figura 2 - Fracionamento do extrato acetônico de embaúba.



#### 4.3. Fracionamento em C18

A fração solúvel em água oriunda do extrato etanólico de embaúba na concentração 9 mg/mL e outra aliquota de 5 mL da fração solúvel em água oriunda do extrato etanólico de lixeira na concentração de 5 mg/mL, foram filtradas em filtro estéril de 0,22  $\mu\text{m}$ . Após a filtração, cada amostra foi injetada em coluna C18, previamente equilibradas com de etanol.

Os compostos retidos após lavagem com água foram extraídos com 2 mL de etanol 70%, onde os primeiros 500  $\mu\text{L}$  foram descartados e os 1500  $\mu\text{L}$  finais foram reservados para obter os compostos que estavam retidos em cada coluna. Essa solução etanólica obtida a partir das duas colunas foi diluída 20 vezes em água, congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  e liofilizada.

#### 4.4. Separação e purificação

As soluções obtidas ao final do processo de fracionamento em coluna C18 foram aplicadas às placas de sílica 20 x 20 cm separadamente. A cromatografia em camada delgada foi realizada utilizando fase móvel contendo acetato de etila, ácido acético, água e ácido fórmico na proporção de 100:11:26:11 (v/v) (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006).

Ao término da corrida cromatográfica o solvente foi evaporado em estufa a  $45^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. As bandas presentes foram raspadas e reservadas em frascos limpos e secos.

A extração dos compostos retidos na sílica presentes em cada banda foi realizada utilizando solução de hidróxido de sódio 15 mM, agitação, centrifugação a 4500  $xg$  e separação do sobrenadante. Esse processo foi repetido duas vezes e o sobrenadante resultante desse processo foi armazenado em frasco estéril para ambas amostras.

Os sobrenadantes foram separados e acidificados utilizando ácido fórmico no volume 100  $\mu\text{L}$  para obtenção de pH 3. O sobrenadante foi injetado novamente na coluna C18 e os compostos retidos foram extraídos utilizando 2 mL de etanol 100%. Os primeiros 500  $\mu\text{L}$  e os 1500  $\mu\text{L}$  reservados de cada

banda foram diluídos em proporção 1:20 em água para liofilização de cada banda.

#### 4.5. Inóculo

Os micro-organismos *S. aureus* isolados de mastite bovina foram fornecidos pelo Laboratório de Saúde Animal do departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (ZAB/FZEA-USP) e as cepas certificadas *S. aureus* ATCC 29213 foram fornecidas pela Professora Doutora Mariza Pires de Melo (ZAB/FZEA-USP).

#### 4.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Utilizou-se Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu-Prominence, composto de bomba quaternária LC-20AD, degaseificador DGU 20-A5, coluna de RP-amida, arranjo duplo de diodos SPD-M20A e software LC Solution version 1.25.

#### 4.7. Determinação de concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos foi determinada através de técnicas baseadas na microdiluição em caldo BHI (brain heart infusion). Foram preparados no mesmo meio de cultura e a densidade óptica foi ajustada segundo a escala de MacFarland ( $10^8$  unidades formadoras de colônia (UFC) / ml) e o procedimento de microdiluição ocorreu na escala de 1:10. As placas foram incubadas a 37°C e os resultados foram registrados após 72 horas (WIEGAND et al., 2008). As análises foram efetuadas em duplicatas em três experimentos independentes.

A classificação como bactericida ou bacteriostático foi realizada utilizando placas de Petri com agar nutriente como meio de cultura. As placas foram semeadas com 100 µL do conteúdo dos poços que apresentaram concentração inibitória mínima igual a 2,5 mg/mL e incubadas a 37°C durante 48 horas.

#### 4.8. Método de diluição em caldo

A metodologia foi adaptada segundo ZGODA e PORTER (2001), utilizando 95 µL de caldo nutriente e 5 µL de inóculo por poço. No primeiro poço foram adicionados 100 µL dos extratos de interesse, filtrados em filtro estéril de porosidade de 0,22 µm, preparado inicialmente na concentração de 5 mg/mL. A temperatura de incubação foi de 37°C durante 24 horas.

A observação do desenvolvimento do inóculo foi acompanhada pela adição de 40 µL de solução aquosa de concentração 2 mg/mL de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) a cada um dos poços, incubados durante 48 horas (HANSEN, NIELSEN, BERG, 1989). Como controle positivo utilizou-se o caldo com o cloranfenicol com a suspensão padronizada de acordo com a escala de McFarland. O controle negativo foi composto de meio de cultura utilizado para a dissolução da suspensão microbiana.

#### 4.9. Determinação de compostos fenólicos

O método utilizado na determinação de compostos fenólicos foi baseado no reativo de Folin-Ciocalteu (FOLIN; CIOCALTEU, 1927). Foram adicionados 100 µL de cada amostra (extrato e frações na concentração de 0,1 mg/mL ) a 500 µL reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, foi adicionado 400 µL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> de concentração 75 g/L. Após 30 minutos a temperatura ambiente a absorbância das reações foram medidas a 765 nm utilizando espectrofotômetro (Hitachi 2810). Como branco utilizou-se uma solução de etanol 1% sem a presença da amostra. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada através de uma curva padrão obtida com ácido gálico. As análises foram efetuadas em duplicata em três experimentos independentes.

#### 4.10. Determinação de flavonoides

Amostras de 50  $\mu\text{L}$  com concentração igual a 1,0 mg/mL foram misturadas a 1150  $\mu\text{L}$  de etanol e 50  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{AlCl}_3$  com concentração igual a 20 mg/mL. A mistura permaneceu em repouso por 40 minutos a temperatura ambiente e a medida da absorvância foi realizada a 415 nm. A quantificação dos flavonoides foi realizada através uma curva padrão obtida com quercetina (SCHWAMBACH *et al.*, 2008). As análises foram efetuadas em duplicata em três experimentos independentes.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Rendimento dos extratos

Considerando que as plantas *C. Pachystachya* e *C. Americana* são conhecidas por seus efeitos biológicos, as folhas foram submetidas a extração com diferentes solventes objetivando a extração de compostos bioativos.

Os rendimentos obtidos na extração de compostos das folhas de *C. pachystachya* e *C. americana* são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Rendimento da extração.

Extração	Massa de folha (g)	Massa de extrato vegetal após liofilização (g)	Rendimento (%)
EA	25	1,55	6,20
EE	25	2,07	8,28
LA	25	1,94	7,76
LE	25	2,46	9,84

EA= extrato acetônico da embaúba, EE= extrato etanólico da embaúba, LA= extrato acetônico da lixeira, LE= extrato etanólico da lixeira.

O rendimento obtido após o fracionamento está apresentado na tabela 2.

Tabela 2 - Rendimento do fracionamento do extrato acetônico.

Extração	Massa de folha (g)	Massa extrato vegetal após liofilização (g)	%
BUF	1	0,36	36,10
AF	1	0,37	37,18

BUF= fração butanólica do extrato acetônico da embaúba, AF= fração aquosa do extrato acetônico da embaúba.

A utilização de etanol como solvente apresentou um rendimento maior em massa quando comparado a extração utilizando acetona e água (7:3) após a liofilização. O método de extração utilizando etanol como veículo para extração dos compostos bioativos presentes nas folhas das plantas além de apresentar maior rendimento em relação a massa tem menor custo e menor toxicidade quando comparado a utilização da acetona como solvente.

O fracionamento em coluna C18 dos extratos etanólicos de embaúba e lixeira em coluna C18 apresentou massa de 11,2 mg e 3,5 mg, respectivamente.

## 5.2. Determinação de compostos fenólicos e flavonoides

Os compostos fenólicos são substâncias abundantemente distribuídos entre as espécies vegetais como pigmentos ou produtos do metabolismo secundário, geralmente oriundos de reações de defesa das plantas contra ataques do ambiente. Esses compostos atuam como antioxidantes, não somente pela sua capacidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que tem a capacidade de impedir a oxidação de vários compostos presentes no alimento, como os lipídeos. (BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER; BERSET, 1995). São constituídos de um anel aromático com uma ou mais hidroxilas substituintes, que incluem seus grupos funcionais (MALACRIDA. MOTTA, 2005)

Os resultados obtidos na determinação dos compostos fenólicos pelo método Folin-Ciocalteu, expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato, são apresentados na tabela 3. O menor teor de compostos fenólicos foi registrado na fração aquosa do extrato acetônico da embaúba. O rendimento da extração utilizando etanol como solvente foi maior.

Embora o etanol tenha apresentado melhor rendimento em termos de massa obtida na extração de compostos das folhas das plantas, sua eficiência em relação a quantidade de compostos fenólicos foi menor quando comparado a extração utilizando acetona (7:3).

A quantidade de compostos fenólicos obtidos no extrato etanólico de embaúba é 54% menor quando comparado ao extrato acetônico (7:3). O extrato acetônico de folhas de lixeira apresentou 26% mais compostos

fenólicos quando comparado ao extrato etanólico. A fração butanólica do fracionamento do extrato acetônico da embaúba apresentou maior concentração de compostos fenólicos quando comparado a fase aquosa.

A fração butanólica (EA-Buf) do extrato acetônico da embaúba apresentou maior concentração de compostos fenólicos. O extrato acetônico de folhas de embaúba apresentou concentração de compostos fenólicos de  $307 \pm 1$  mg/g de extrato e esse resultado está em concordância com os dados obtidos com o extrato metanólico de folhas de embaúba que apresentou concentração de 326 mg/g de extrato segundo Aragão (2010).

A determinação de flavonoides mostrou, assim como na determinação de compostos fenólicos, haver diferença significativa entre as soluções extrativas no que se refere a quantidade de flavonoides e compostos fenólicos extraídos. O extrato acetônico apresentou maior concentração de flavonoides. O fracionamento do extrato acetônico de folhas de embaúba com butanol apresentou concentração de flavonoides na fase denominada EA-Buf de aproximadamente  $75 \pm 1$  mg/g de extrato e esse resultado está em concordância com os dados obtidos com o extrato metanólico de folhas de embaúba que apresentou concentração de 83 mg/g de extrato segundo Aragão (2010).

Os resultados obtidos na determinação de flavonoides utilizando curva padrão de quercetina, expressos como equivalentes de quercetina (QUE) por g de extrato, são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Quantidade de compostos fenólicos e flavonóides

Extração	Flavonóides	Compostos fenólicos
	mg de QUE /g de extrato± ER	mg de EAG /g de extrato± ER
EA	122 ± 2	307 ± 1
EE	72 ± 1	141 ± 2
LA	79 ± 1	237 ± 1
LE	68 ± 1	200 ± 1
EA-BUF	75 ± 1	488 ± 3
EA-AAF	19 ± 1	244 ± 3

EA= extrato acetônico da embaúba, EE= extrato etanólico da embaúba, LA= extrato acetônico da lixeira, LE= extrato etanólico da lixeira, EA-BUF= fração butanólica do extrato acetônico da embaúba, EA-AAF= fração aquosa do extrato acetônico da embaúba. , EAQ = equivalentes de ácido gálico, EQU = equivalentes de quercetina, ER = erro médio.

### 5.3. Separação e purificação

A caracterização de flavonoides por cromatografia em camada delgada apresentou diferenças no perfil cromatográfico entre os extratos de lixeira e embaúba. Foi observada a presença de bandas características de diversas colorações, que caracterizam a presença de flavonoides.

A figura 3 apresenta a separação de compostos presentes nos extratos etanólicos de folhas de *C. americana* e *C. pachystachya* a partir da cromatografia em camada delgada. A coluna da esquerda apresenta as bandas obtidas a partir do fracionamento em C18 da fase solúvel em água do extrato etanólico de *C. Americana* e a coluna da direita apresenta as bandas obtidas a partir do fracionamento em C18 da fase solúvel em água do extrato etanólico de *C. Pachystachya*.



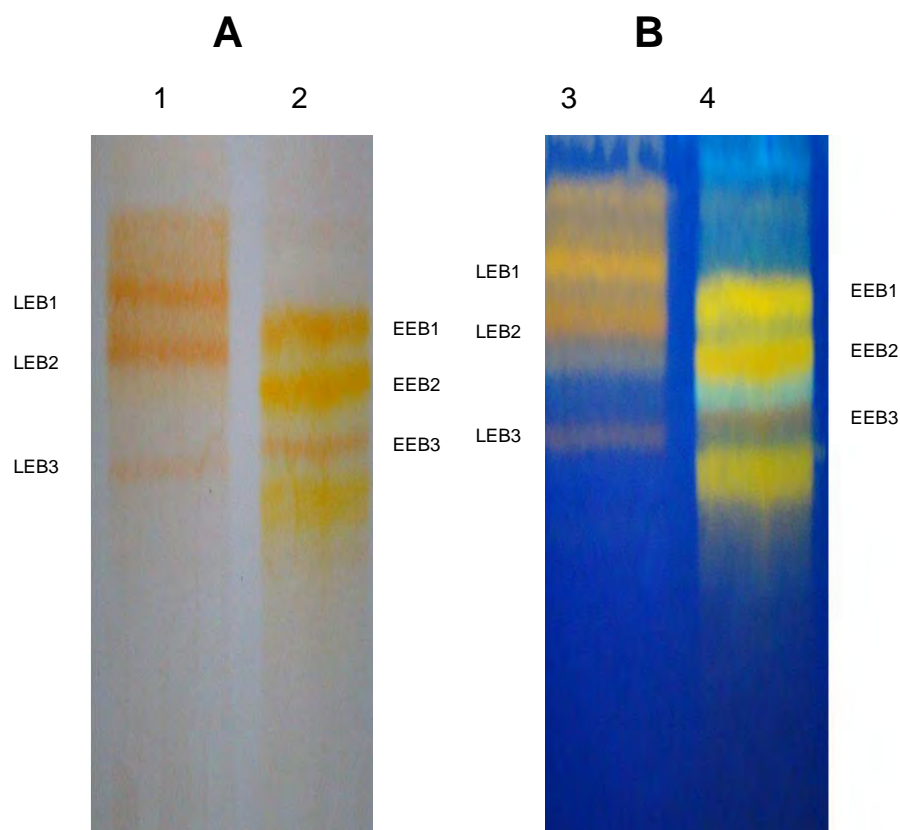


Figura 3 – Cromatografia em camada delgada dos extratos de *C. pachystachya* (canaletas 2 e 4) e *C. americana* (canaletas 1 e 3) após extração em fase sólida utilizando cartucho C18. **A**- sem revelação **B**- revelação NP/PEG visualizada em 365 nm.

A massa obtida após a extração dos compostos presentes em cada banda e separação em C18, após liofilização e os fatores de retenção cromatografia em camada delgada (CCD) de cada banda estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Fator de retenção ( $R_f$ ) e rendimento.

Banda	$R_f$ EE	$R_f$ LE	EE (mg)	LE (mg)
1	0,8	0,9	1,2	4,8
2	0,7	0,8	3,5	5,7
3	0,5	0,7	4,2	3,5

EE= extrato etanólico da embaúba e LE = extrato etanólico da lixeira

Os compostos isolados por CCD extrato etanólico de embaúba foram submetidos a cromatografia líquida de alta eficiência (figura 4) para verificação

da pureza do composto isolado. O tempo de retenção (RT) observado para EEB1 foi de 23,4 minutos e para EEB2 foi de 23,7 minutos. O RT do composto EEB1 é equivalente ao tempo de retenção para o padrão do flavonoide orientina (luteolina-8-C-glicosídeo), molécula também confirmada por Cruz (2013).

Os compostos isolados do extrato etanólico da lixeira não foram submetidos a análise em cromatógrafo líquido de alta eficiência porque não apresentaram atividade inibitória para *S. aureus* na concentração avaliada, diferentemente dos compostos isolados do extrato etanólico de folhas de embaúba.

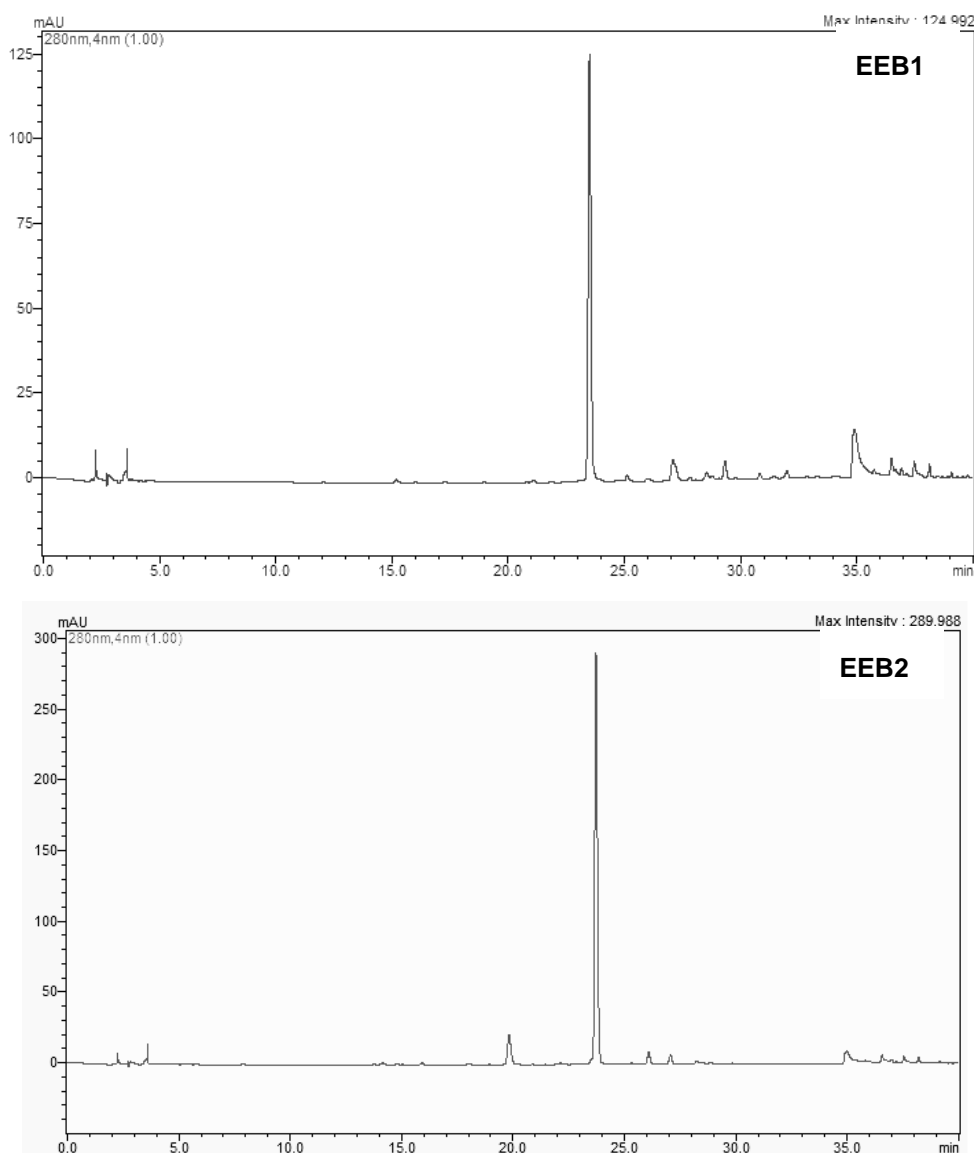


Figura 4 - Análise de EEB1 e EEB2 por HPLC-DAD (280 nm)

#### 5.4. Determinação do CIM em isolado de *S. aureus*

A concentração mínima inibitória para os extratos brutos e frações foi igual a 2,5 mg/mL. Os extratos de folhas de embaúba foram caracterizados como bactericida e os extratos brutos de folhas de lixeira, frações EE-Buf , EE-AF apresentaram atividade bacteriostática. Todos os experimentos foram realizados utilizando também a cepa *S. aureus* ATCC 29231.

Os experimentos foram realizados utilizando os mesmos extratos, que foram armazenados durante 180 dias a -20°C. Esses demonstraram que os compostos ativos apresentam estabilidade porque os resultados foram igualmente reproduzidos sobre cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina e *S. aureus* ATCC 29231.

Os mesmos resultados foram obtidos utilizando extratos e frações que não passaram por filtração antes de serem utilizados como inibidor. O caráter bactericida e bacteriostático foi conservado e os valores para as concentrações inibitórias mínimas se mativeram inalterados.

A captura em fase sólida utilizando coluna C18 dos extratos etanólicos de folhas de embaúba e lixeira apresentaram poder bactericida na concentração mínima de 2,5 mg/mL.

As bandas EEB1 e EEB3 do extrato etanólico da embaúba apresentaram caráter bactericida na concentração mínima inibitória de 2,5 mg/mL enquanto a banda EEB2 do extrato etanólico da embaúba apresentou-se bactericida na concentração de 1,25 mg/mL. As bandas LEB1 , LEB2 e LEB3 do extrato etanólico da lixeira não apresentaram inibição na concentração avaliada de 2,5 mg/mL.

## 6. Conclusões

A extração realizada com acetona (7:3) apresenta maior concentração de compostos fenólicos e flavonoides e menor massa de extrato bruto, ao contrário da extração utilizando etanol (100%) que apresenta maior rendimento em massa e menor concentração de compostos fenólicos e flavonoides.

Os extratos acetônico e etanólico de folhas de embaúba apresentam atividade bactericida na concentração inibitória mínima igual a 2,5 mg/mL. O fracionamento do extrato acetônico com butanol resultou em duas fases denominadas EA-Buf e EA-Af, e ambas apresentam atividade bacteriostática sobre *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina na concentração de 2,5 mg / mL.

Os extratos etanólico e acetônico (7:3) de folhas de lixeira apresenta atividade bacteriostática na concentração inibitória mínima igual a 2,5 mg/mL.

Os extratos brutos de embaúba e as frações EA-Buf e EA-Af apresentaram estabilidade após 180 dias conservados a temperatura de -20°C mantiveram níveis similares de atividade antibacteriana.

Foi observado que a captura em fase sólida em C18 do extrato etanólico de folhas de lixeira e embaúba apresenta atividade bactericida sobre *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina na concentração de 2,5 mg/mL.

Os compostos isolados em CCD a partir da captura em fase sólida em C18 do extrato etanólico de folhas de lixeira denominados LEB1, LEB2 e LEB3 não apresentam atividade sobre os micro-organismos. Esse resultado demonstra que o efeito bactericida pode ser decorrente da associação dos compostos.

Os compostos isolados em CCD a partir da captura em fase sólida em C18 do extrato etanólico de folhas de embaúba denominados EEB1 e EEB3 apresentam potencial bactericida na concentração inibitória mínima igual à 2,5 mg/mL.

O composto isolado EEB2 EE apresentou potencial bactericida na concentração inibitória mínima igual a 1,25 mg/mL.

## **7. Perspectivas**

Novos estudos associando produtos naturais a fármacos usualmente utilizados no controle da mastite bovina como: amoxicilina, penicilina, oxacilina, gentamicina, enrofloxacina, tetraciclina e norflaxacina, poderão potencializar os efeitos antibióticos.

## 8. Referências

ALEXANDRE-MOREIRA, M.S., PIUVEZAM, M.R., ARAUJO, C.C., THOMAS, G. Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Curatella americana* L. **Journal of Ethnopharmacology** 67, 1999, 171-177.

ARAGÃO, D.M.O., GUARIZE, L., LANINI, J., DA COSTA, J.C., GARCIA, R.M.G., SCIO, E. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology** 128, 2010, 629-633.

AVANCINI, C., WIEST, J.M., DALL'AGNOL, R., HAAS, J.S., VON POSER, G.L. **Antimicrobial activity of plants used in the prevention and control of bovine mastitis in southern Brazil**. Latin American Journal of Pharmacy 27, 2008 894-899.

BARTLETT, P. C.; VAN WIJK, J.; WILSON, D. J.; GREEN, C. D.; MILLER, G. Y.; MAJEWSKI, G. A.; HEIDER, L. E. Temporal patterns of lost milk production following clinical mastitis in a large Michigan Holstein herd. **Journal of Dairy Science**, Chanpaign-IL v. 74,1991, 1561-1572.

BENOIT-VICAL, F., IMBERT, C., BONFILS, J.P., SAUVAIRE, Y. **Antiplasmodial and antifungal activities of iridal, a plant triterpenoid**. Phytochemistry 62, 2003, 747-751.

BERGMANN, B.R., COSTA, S.S., MORAES, V.L.G. Brazilian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. **Brazilian Journal Association for the Advancement of Science** 49, 1997, 395-402.

BLOWEY, R.; EDMONDSON, P. **Mastitis**: causas, epidemiología y control. Zaragoza: Acríbia, 1999. 39 p.

BOTARO, B.; SANTOS, M. V. **Conhecendo melhor a mastite ambiental**: parte 1. Postado em: 08/09/2008 Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/qualidade-do-leite/conhecendo-melhor-a-mastite-ambiental-parte-1-47844n.aspx>>. Acesso em: 24 de maio de 2013

BOUCHARD, D.S., RAULT, L., BERKOVA, N., LE LOIR, Y., EVEN, S. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. **Applied and Environmental Microbiology** 79, 2013, 877-885.

BRAMLEY, A. J.; CULLOR, J. S.; ERSKINE, R. J.; FOX, L. K.; HARMON, R. J.; HOGAN, J. S.; NICKERSON, S. C.; OLIVER, S. P.; SMITH, K. L.; SORDILLO

L. M. **Current Concepts of Bovine Mastitis**. 4. ed. Madison: National Mastitis Council, 1999. 64 p.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. Lebensmittel-Wissenschaft Technologie, London, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Portaria 56 de 07 de dezembro de 1999. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Legislativo, Brasília, DF, 8 dez. 1999, 34-49.

BRITO, L. G.; SALMAN, A. K. D.; GONÇALES, M. A. R.; FIGUEIRÓ, M. R. **Cartilha para o produtor de leite de Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2007.40 p. (Embrapa Rondônia. Documentos, 116).

BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F.; BRITO, J. R. F. Testando a qualidade do leite. In: DURÃES, M. C.; MARTINS, C. E.; DERESZ, F.; BRITO, J. R. F.; FREITAS, A. F.; PORTUGAL, J. A. B.; COSTA, C. N. MINAS LEITE. 2., 2000, Juiz de Fora. **Avanços tecnológicos para o aumento da produtividade leiteira**: anais. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000. p. 83-94.

CARDOSO, H.T.; SANTOS, M.L. **Estudos sobre a presença de antibióticos nos vegetais**. Bras. Med., São Paulo, v. 62, p67-70, 1948.

CONSOLINI, A.E., RAGONE, M.I., MIGLIORI, G.N., CONFORTI, P., VOLONTE, M.G. Cardiotonic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. **Journal of Ethnopharmacology** 106, 2006.

CORTEZ, D.A.G., YOUNG, M.C.M., MARSTON, A., WOLFENDER, J.L., HOSTETTSMANN, K. Xanthonenes, triterpenes and a biphenyl from *Kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry** 47, 1998, 1367–1374.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista da Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v. 1, 1998, p. 3-7.

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; MORANDI, S.; LODI, R.; VIMERCATI, C.; AGNELLINI, D.; CARAMENTI, G.; MORONI, P.; CASTIGLIONI, B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**, Columbia, SC, USA, v. 19, n. 5, oct. p.299-305, 2005.

CRUZ, E.D.M., SILVA, E.R.D., MAQUIAVELI, C.D.C., ALVES, E.S.S., A, J.F.L.J., REIS, M.B.G.D., TOLEDO, C.E.M.D., CRUZ, F.G., VANNIER-SANTOS, M.A. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry** 89, 2013, 71-77.

CRUZ, F.G., DA SILVA-NETO, J.T., GUEDES, M.L.S. Xanthonés and coumarins from *Kielmeyera lathrophyton*. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 12, 2001, 117-122.

CRUZ, F.G., MOREIRA, L.D., SANTOS, N.A.S., GUEDES, M.L.S. Additional coumarins from *Kielmeyera reticulata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 13, 2002, 704-707.

DALL'ACQUA, S., INNOCENTI, G., VIOLA, G., PIOVAN, A., CANIATO, R., CAPPELLETTI, E.M., 2002. Cytotoxic compounds from *Polygala vulgaris*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** 50, 1499-1501.

DE TOLEDO, C.E.M., BRITTA, E.A., CEOLE, L.F., SILVA, E.R., DE MELLO, J.C.P., DIAS FILHO, B.P., NAKAMURA, C.V., UEDA-NAKAMURA, T. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaca as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology** 133, 2011, 420-425.

ELAZIZI, M.M., ATEYA, A.M., SVOBODA, G.H., SCHIFF, P.L., SLATKIN, D.J., KNAPP, J.E. Chemical-constituents of *Curatella americana* (DILLENIACEAE). **Journal of Pharmaceutical Sciences** 69, 1980, 360-361.

FOLIN, O., CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry** 73, 1927, 627-650.

FRANCA, C.A., PEIXOTO, R.M., CAVALCANTE, M.B., MELO, N.F., OLIVEIRA, C.J.B., VESCHI, J.A., MOTA, R.A., COSTA, M.M. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. from small ruminant mastitis in Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira** 32, 2012, 747-753.

HANSEN, M.B., NIELSEN, S.E., BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell-growth cell kill. **Journal of Immunological Methods** 119, 1989, 203-210.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal Dairy Science**, Champaign-IL, v. 77, 1994, 2103-2113.

HERNANDEZ-TERRONES, M.G., MORAIS, S.A.L., LONDE, G.B., NASCIMENTO, E.A., CHANG, R. Ação alelopática de extratos de embaúba (*Cecropia pachystachya*) no crescimento de capim-colonião (*Panicum maximum*), **Planta Daninha**, 25, nº 4, 2007 763-769.

HIKAWCZUK, V.J., SAAD, J.R., GUARDIA, T., JUAREZ, A.O., GIORDANO, O.S. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Cecropia pachystachya*. **Anales De La Asociacion Quimica Argentina** 86, 1998, 167-170.



HILLERTON, J. E. Controle da mastite bovina. In: WORKSHOP SOBRE PROGRAMA DE CONTROLE INTEGRADO DA MASTITE BOVINA, 1996, Juiz de Fora. Anais. de Juiz de Fora: Embrapa, 1996. 1 CD-ROM.

HIRUMA-LIMA, C.A., RODRIGUES, C.M., KUSHIMA, H., MORAES, T.M., LOLIS, S.D., FEITOSA, S.B., MAGRI, L.P., SOARES, F.R., COLA, M.M., ANDRADE, F.D.P., VILEGAS, W., BRITO, A.R.M.S., 2009. The anti-ulcerogenic effects of *Curatella americana* L. **Journal of Ethnopharmacology** . 121, 425-432.

HORTET, P.; SEEGERS, H. Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, Ithaca, NY, USA, v. 37,1-20, 1998.

IINUMA, M., TOSA, H., TANAKA, T., KANAMARU, S., ASAI, F., KOBAYASHI, Y., MIYAUCHI, K., SHIMANO, R. Antibacterial activity of some Garcinia benzophenone derivatives against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** 19, 1996, 311 – 314.

LIMA, E.O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Argos, Chapecó, p. 479-499, 2001.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology** 49, 1995, 57 – 68.

Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2002. **Plantas medicinais do Brasil**, edição 1. Nova Odessa. Instituto Plantarum, São Paulo.

MACHADO, C. A.; DEMETRIO, P. F.; BORGES, C. G. Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas de alta produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF,. v. 38, n. 12, 2003, 1451-1457.

MALACRIDA C.R., MOTTA.S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência Tecnologia Alimentos** 25, 2005, 659-664.

MANCIBO, F., HILJE, L., MORA, G.A., SALAZAR, R. Biological activity of two neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) products on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera : Pyralidae) larvae. **Crop Protection** 21, 2002,107-112.

Marston, A.; Hostettmann, K. Separation and Quantification of Flavonoids. In: Andersen, Ø. M.; Markham, K.R. Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications. USA: CRC Press, 2006. p.12.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products** 66, 2003, 1022-1037.

NIERO, R. **Obtenção de novas moléculas com atividade analgésica e antiinflamatória a partir de plantas medicinais brasileiras.** 2000, Tese (Doutorado) Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Curso de Pós Graduação em Química. UFSC, Florianópolis, SC.

PEDERSON, C.S.; FISHER, P. Bactericidal activity of vegetable juice. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v. 47, 1984, 421-422.

PERES NETO, F.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Graça, SP, a. 9, n. 16, 2011.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. **Mastitis: Counter Attack.** Naperville: Babson Bros, 1991. 150p.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos.** 9.Ed. Rio de Janeiro. Guanabara koogan. 2002.

REGASSA, F., ARAYA, M. In vitro antimicrobial activity of *Combretum molle* (Combretaceae) against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* isolated from crossbred dairy cows with clinical mastitis. **Tropical Animal Health and Production** 44, 2012, 1169-1173.

SCHINELLA, G., AQUILA, S., DADE, M., GINER, R., RECIO, M.D., SPEGAZZINI, E., DE BUSCHIAZZO, P., TOURNIER, H., RIOS, J.L. Anti-inflammatory and apoptotic activities of pomolic acid isolated from *Cecropia pachystachya*. **Planta Medica** 74, 2008, 215-220.

SCHWAMBACH, J., RUEDELL, C.M., DE ALMEIDA, M.R., PENCHEL, R.M., DE ARAUJO, E.F., FETT-NETO, A.G. Adventitious rooting of *Eucalyptus globulus* x *maidennii* mini-cuttings derived from mini-stumps grown in sand bed and intermittent flooding trays: a comparative study. **New Forests** 36, 2008, 261-271.

SILVA, M. V. M.; ARAÚJO, K. P. C. Mastite e qualidade do leite. **Revista Veterinária e Zootecnia em Minas**, Belo Horizonte, p. 20–23, out./dez. 2008.

SIMÕES, T.V.M.D., DE OLIVEIRA, A.A. **Mastite bovina : considerações e impactos econômicos** Embrapa Tabuleiros Costeiros,. – Aracaju : 2012. Disponível em [http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes\\_2012/doc\\_170.pdf](http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/doc_170.pdf). Acesso em 24/05/2012.

SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. Environmental mastitis: know your opponent. **NMC Regional Meeting Proceedings.** (2008). Disponível em : <<http://nmconline.org/articles/EnvMastitis.pdf>. Acesso em: 24 maio. 2013.

- S.B. Soraru, A.L. Bandoni **Plantas de la medicina popular Argentina**, Albatros, Buenos Aires, 1978.
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos**. 3ed. São Paulo: Atheneu, 1984,374p.
- TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M. B. N.; ALMEIDA, L. R. de. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano VI, n.10, 2008.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia** 3ed. São Paulo: Atheneu, 1999.
- UCHOA, V.T., DE PAULA, R.C., KRETTLI, L.G., GOULART SANTANA, A.E., KRETTLI, A.U. Antimalarial Activity of Compounds and Mixed Fractions of *Cecropia pachystachya*. **Drug Development Research** 71, 2010, 82 – 91.
- VEIGA JUNIOR, V.F., PINTO, A.C., MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: Cura segura?, **Química Nova** , 2005, 29,519-528.
- VOSS, E.G. An integrated system of classification of flowering plants - CRONQUIST,A. **Economic Botany** 37, 1983.
- WIEGAND, I., HILPERT, K., HANCOCK, R.E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols** 3, 2008,163-175.
- XU, H.X.; LEE, S.F. Activity of plants flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. **Phytother. Res.**, v.15, n. 1. p.39-43, 2001.
- YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, p. 18-42, 2001.
- ZGODA, J.R., PORTER, J.R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. **Pharmaceutical Biology** 39, 2001, 221 – 225.