

NATASHA LAGOS MAIA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE SUBSTÂNCIAS
EXTRAÍDAS DO FRUTO DE *Garcinia brasiliensis* SOBRE
ISOLADOS DE *Streptococcus* spp. OBTIDOS DE MASTITE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

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

T

M217p
2016
Maia, Natasha Lagos, 1987-
Potencial antimicrobiano de substâncias extraídas do fruto de *Garcinia brasiliensis* sobre isolados de *Streptococcus* spp. obtidos de mastite / Natasha Lagos Maia. - Viçosa, MG, 2016.
xiv, 47f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.35-41.

1. Bovino de leite - Doenças - Controle. 2. Mastite bovina. 3. Bactérias - Resistência. 4. Fitoterapia. 5. *Garcinia brasiliensis*. 6. *Streptococcus*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.0869112

NATASHA LAGOS MAIA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE SUBSTÂNCIAS EXTRAÍDAS DO
FRUTO DE *Garcinia brasiliensis* SOBRE ISOLADOS DE *Streptococcus* spp.
OBTIDOS DE MASTITE**

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

APROVADA: 01 de agosto de 2016.



Silvia Almeida Cardoso




Fábio Alessandro Pieri



Leandro Licursi de Oliveira
(Coorientador)



Leandro Abreu da Fonseca
(Coorientador)



Marcelo Henrique dos Santos
(Coorientador)



Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
(Orientador)

Dedico aos irmãos de jornada.

“Não é sinal de saúde estar bem adaptado a uma sociedade doente”

Jiddu Krishnamurti (1895 – 1986)

AGRADECIMENTOS

Àquele que guia e ilumina o meu caminho com as belezas de sua criação, fazendo-me reagir com sorrisos a cada obstáculo inesperado, ensinando que não há o que temer quando o caminho é de bondade e amor.

À Universidade Federal de Viçosa, por possibilitar que tantos estudantes recebam ensino de qualidade em um ambiente que nos proporcione tamanho bem-estar.

À CAPES por ter concedido bolsa de doutorado para minha manutenção na pós-graduação.

Às agências FAPEMIG e CNPq pelo auxílio financeiro que proporcionou a apresentação de trabalhos e resumos em eventos, a ida em congressos, simpósios, dentre outros.

À orientadora Cidinha, por sua coragem e bondade em aceitar-me faltando somente dois anos para conclusão oficial do doutorado, mesmo sabendo das questões de saúde pelas quais eu estava passando, e também, por toda compreensão que estas mesmas questões exigiram, por terem se estendido ao longo de todo o processo até os dias de hoje.

Aos professores Leandro Licursi, Silvia Cardoso e Marcelo Henrique dos Santos, por terem aceitado me coorientar nesta pesquisa. Saibam que foi fundamental ter pessoas que exercem tão bem o papel de orientar, trazendo sempre a tranquilidade que vocês trazem, pois só assim pude perseverar em momentos onde tudo parecia perdido.

À Filippe Gadiolli Pimentel, por ter sido um grande companheiro de vida nesta fase do doutorado e ter me ajudado tanto na superação de um dos maiores obstáculos que encontrei no caminho, minha gratidão é e será sempre eterna.

Aos amigos de longa data Rafael Maziolli, Iolanda Barbosa e Graziella Vasconcellos por me ensinarem que amizades verdadeiras são desprovidas de cobrança e nos aceitam independente das condições pelas quais passamos. Sou infinitamente grata por não desistirem de mim.

Aos meus pais, por terem proporcionado o que de melhor puderam para que eu galgasse o caminho que escolhi e, também, por todo apoio diante das minhas decisões.

À Maria Fialho e Aninha, por utilizarem a desculpa de fazer faxina e lavar minhas roupas, respectivamente, quando, na verdade, foram como mães para mim durante toda a pós-graduação.

À Martha Realpe, por ser um grande presente de Deus em minha vida, demonstrando sempre tamanha doçura e compreensão através de seus atos e palavras.

À Camila Lujambio e sua linda família, por serem tão carinhosas comigo.

À Rosi e Beth, por sempre nos ajudarem a administrar nossas vidas na pós-graduação, nos tratando sempre com muito amor e compreensão. Muito obrigada, meninas!

À equipe LDBAC-DVT/UFV por se esforçarem, a cada dia, para construção de um laboratório referência. Fico feliz em saber que deixarei um tijolinho nesta construção.

Aos técnicos da Microbiologia do Departamento de Medicina Veterinária-DVT, em especial, Seu Luís, Marquinhos e Élcio, por sempre demonstrarem grande disposição em ajudar-nos ao longo do desenvolvimento de nossos experimentos.

À equipe do LIG-DBG/UFV, por me acolherem tão bem neste ambiente de trabalho tão agradável e me fazerem rir todos os dias! Sem dúvida, vocês trouxeram motivação para eu seguir em frente e chegar até aqui!

Aos técnicos da Microbiologia do Departamento de Biologia, Rachel, Seu Zé e Amanda, que me ajudaram quando da falta temporária da estufa a 37°C, e também pelo jeito querido com o qual me acolheram.

Aos amigos Rafael, Mary Hellen e Raphael Klein e Janine, por terem ajudado, de forma tão solícita, em todos os momentos em que necessitei, dispondo de tempo para demonstração de técnicas que desconhecia na prática.

Aos conselhos e carinho de todos da lanchonete e copiadora do Centro de Vivências do Itaú.

Aos amigos eternos da Livraria UFV, que todos os dias me faziam rir enquanto eu tomava o tal expresso duplo!

Ao Grupo de Percussão “O Bloco”/UFV, que simplesmente mudou a minha vida, me trazendo a grande riqueza de compreender, viver e amar as diferenças que existem entre as culturas e os seres humanos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Importância da produção leiteira	2
2.2 Mastite bovina	4
2.3 Substâncias bioativas - Tratamento alternativo para a mastite	8
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo geral	15
3.2 Objetivos específicos	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Isolados bacterianos	16
4.2 Substâncias bioativas	17
4.3 Antimicrobianos sintéticos	17
4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM	18
4.5 Interações entre antimicrobianos sintéticos e substâncias bioativas	18
4.6 Teste de citotoxicidade	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1 Concentração Inibitória Mínima – CIM	23
5.2 Teste de Sinergismo	27
6. CONCLUSÕES.....	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
ANEXO I.....	42
ANEXO II.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da gutiferona-A.....	12
Figura 2. Estrutura química da 7-epiclusianona.	12
Figura 3 – Árvore da espécie <i>Garcinia brasiliensis</i>	13
Figura 4 – Frutos (bacupari) na árvore <i>G. brasiliensis</i>	13
Figura 5 – Montagem de teste de sinergismo - método <i>Checkerboard</i> adaptado.....	19
Figura 6 – Isobograma demonstrativo das possíveis linhas de tendência resultantes das interações entre duas substâncias.....	20
Figura 7 – Concentrações testadas de antimicrobianos sintéticos e substâncias bioativas para avaliação da citotoxicidade em células epiteliais da glândula mamária de bovinos (MAC-T).....	21
Figura 8 – Valores das absorbâncias médias, obtidas por testes realizados em triplicatas, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da gutiferona-A e 7-epiclusianona para <i>Streptococcus uberis</i> (Su959) e <i>Streptococcus agalactiae</i> (Sa4605).....	23
Figura 9 – Valores das médias das absorbâncias realizadas em triplicatas para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos sintéticos para <i>Streptococcus uberis</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>	25
Figura 10 – Isobograma referente à interação sinérgica entre as frações de CIM M6959 e CIM A959; CIM= Concentração Inibitória Mínima; M6= 7-epiclusianona; A = Ampicilina; 959: <i>Streptococcus uberis</i>	27
Figura 11 - Isobograma referente à interação sinérgica entre as frações de CIM M6959 e CIM G959.....	28
Figura 12 - Isobograma referente à interação sinérgica entre as frações de CIM M11959 e CIM A959.....	28
Figura 13 - Isobograma referente à interação sinérgica entre as frações de CIM M11959 e CIM G959.....	29
Figura 14 - Isobograma referente à interação sinérgica predominante e tendência final de interação antagonista entre CIM M64605 e CIM A4605.....	30
Figura 15 - Isobograma referente à interação sinérgica entre CIM M64605 e CIM G4605. CIM= Concentração Inibitória Mínima.....	30
Figura 16 - Isobograma referente à interação aditiva na primeira metade da curva e interação antagonista na outra metade, entre CIM M114605 e CIM A4605.....	31
Figura 17 - Isobograma referente à interação sinérgica entre CIM M114605 e CIM G4605.....	31

Figura 18 – Valores percentuais de densidade óptica (D.O.), calculados a partir da leitura das absorbâncias dos ensaios de citotoxicidade em cultivo de células epiteliais da glândula mamaria bovina (MAC-T) às concentrações determinadas a partir da Concentração Inibitória Mínima (CIM), para cada antimicrobiano selecionado frente a Su959 e Sa4605..... 33

ANEXO I

Figura A' - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da gutiferona-A (M11) para *Streptococcus uberis* (Su959).

Figura A'' - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da gutiferona-A (M11) para *Streptococcus agalactiae* (Sa4605).

Figura B' - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da 7-epiclusianona (M6) para *Streptococcus uberis* (Su959).

Figura B'' - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da 7-epiclusianona (M6) para *Streptococcus agalactiae* (Sa4605).

ANEXO II

Figura A - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da ampicilina para *Streptococcus uberis* (Su959).

Figura A* - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da ampicilina para *Streptococcus agalactiae* (Sa4605).

Figura B - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de amoxicilina com clavulanato para *Streptococcus uberis* (Su959).

Figura B* - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) amoxicilina com clavulanato para *Streptococcus agalactiae* (Sa4605).

Figura C - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de ceftriaxona para *Streptococcus uberis* (Su959).

Figura C* - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de ceftriaxona para *Streptococcus agalactiae* (Sa4605).

Figura D - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de gentamicina para *Streptococcus uberis* (Su959).

Figura D* - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de gentamicina para *Streptococcus agalactiae* (Sa4605).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) das substâncias bioativas determinadas para Su959 e Sa4605.....23

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos sintéticos e condição de suscetibilidade de *Streptococcus uberis* (Su959) e *Streptococcus agalactiae* (Sa4605).....24

RESUMO

MAIA, Natasha Lagos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2016. **Potencial antimicrobiano de substâncias extraídas do fruto de *Garcinia brasiliensis* sobre isolados de *Streptococcus* spp. obtidos de mastite.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Coorientadores: Leandro Licursi de Oliveira, Marcelo Henrique dos Santos, Leandro Abreu da Fonseca e Raphael Contelli Klein.

A mastite bovina é uma enfermidade de grande ocorrência em rebanhos leiteiros de todo o mundo, constituindo assim, um cenário preocupante, devido aos impactos na saúde pública e também na economia dos países, principalmente o Brasil, pois é um dos maiores produtores de leite. Concomitantemente à ocorrência da mastite, é crescente o número de isolados bacterianos causadores desta doença que têm apresentado resistência antimicrobiana às mais diversas substâncias farmacológicas, principalmente, devido à utilização indiscriminada destas drogas. A investigação de novas moléculas com potencial antimicrobiano, assim como o uso de associações com as drogas tradicionais, tornou-se de grande necessidade. Este trabalho teve como objetivo, investigar a ação antimicrobiana de duas substâncias bioativas, a gutiferona-A (M11) e 7-epiclusianona (M6), sobre isolados de campo, *Streptococcus uberis* (Su959) e *Streptococcus agalactiae* (Sa4605) obtidos de leite de animais com mastite. Realizaram-se testes para definição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos sintéticos e das substâncias bioativas, as quais variaram a de 0,6 a 125 µg/mL. Foi confirmado o potencial antimicrobiano destes últimos, além da ineficácia da ampicilina e gentamicina no controle da multiplicação de ambos os isolados. Após esta constatação, foi investigada a presença de interações sinérgicas, utilizando o método *Checkerboard* a partir de combinações de M11 e M6 com ampicilina e gentamicina. Dentre oito associações determinadas, seis apresentaram interação sinérgica positiva, evidenciando a recuperação e potencialização da ação dos antimicrobianos sintéticos frente aos isolados bacterianos estudados, antes resistentes à ação individual dos mesmos. Usando a metodologia do teste do MTT ((3-[-4,5- dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolium brometo), avaliou-se a viabilidade celular quando da exposição individual de cada antimicrobiano (sintético e bioativo), a fim de conhecer o caráter citotóxico destas sobre as células MAC-T (células epiteliais da glândula mamaria de bovinos). O resultado obtido mostrou que somente a M11 foi citotóxica nas concentrações 2xCIM e 1xCIM determinada previamente na presença de Su959 e 2xCIM determinada previamente na presença de Sa4605. Porém, as concentrações

necessárias para potenciar ação dos antimicrobianos sintéticos são doses iguais ou abaixo de 0,5xCIM, não indicadas como tóxicas no teste *in vitro*. Assim, pode-se afirmar que a gutiferona-A e 7-epiclusianona apresentaram eficaz ação antimicrobiana individual sobre os isolados de campo de *Streptococcus uberis* e *Streptococcus agalactiae*, além de se mostrarem promissoras candidatas para serem utilizadas em associações com os antimicrobianos sintéticos ampicilina e gentamicina, a fim de recuperar e otimizar a ação antimicrobiana dos mesmos.

ABSTRACT

MAIA, Natasha Lagos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2016. **Antimicrobial potential of substances extracts from *Garcinia brasiliensis* fruit on isolates of *Streptococcus* spp. obtained from mastitis.** Advisor: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-advisors: Leandro Licursi de Oliveira, Marcelo Henrique dos Santos, Leandro Abreu da Fonseca and Raphael Contelli Klein.

Bovine mastitis is a disease of high occurrence and widespread in herds around the world, making it a worrying scenario due to the impacts on public health and also on the countries' economies, especially Brazil, due its large produce of milk. In meanwhile, the number of resistant bacterial isolates has been increased against a variety of pharmacological medicines, mostly because of drug-indiscriminate use. The investigation of new molecules with antimicrobial potential, as well as the association with traditional drugs, became a great necessity nowadays. The aim of this study was to investigate the antimicrobial action of two bioactive substances, gutiferone-A (M11) and 7-epiclusionone (M6), on wild isolates *Streptococcus uberis* (Su959) and *Streptococcus agalactiae* (Sa4605) obtained from animals infected with mastitis. Analysis were conducted to define the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of synthetic antimicrobials and bioactive molecules, ranging from 0.6 to 125 µg/mL. The antimicrobial potential of the latter was confirmed, besides the inefficacy of ampicillin and gentamicin in control of the multiplication of both isolates. Later, the presence of synergistic interactions was investigated, using the Checkerboard method from combinations of M11 and M6 with ampicillin and gentamicin. Among the eight selected associations, six showed positive synergic interaction showing a recovery and powering the action of the synthetic antimicrobials against the bacterial isolates studied, previously resistant to their individual action. To assess the cell viability, we performed the method MTT (3 - [- 4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), with individual exposure of each antimicrobial (synthetic and bioactive) targeting the MAC-T cells (bovine mammary gland epithelial cells). The results showed that only M11 was cytotoxic at 2xMIC and 1xMIC concentrations previously determined by Su959 presence. However, concentrations doses equal to or lower than 0.5x MIC are need to potentiate the action of synthetic antimicrobials, not indicated as toxic in the *in vitro* test. Thus, the gutiferone-A and 7-epiclusionone showed an effective antimicrobial action on the wild isolates of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae*, in addition to being promising candidates for use in

combinations with the synthetic antimicrobials ampicillin and gentamicin, in order to recover and optimize their antimicrobial action.

1. INTRODUÇÃO

A mastite bovina é comprovadamente a enfermidade de maior ocorrência nos rebanhos leiteiros de todo mundo e constitui um cenário preocupante gerador de grandes impactos na saúde pública e, conseqüentemente, na economia do Brasil, visto este ser um dos maiores países produtores de leite do mundo.

Diante desta problemática, inúmeros são os esforços dos envolvidos na atividade leiteira para controlar a ocorrência e/ou persistência desta enfermidade nos rebanhos leiteiros, dentre os quais está a utilização dos antimicrobianos sintéticos de forma indiscriminada, adotando-se condutas terapêuticas equivocadas, inclusive sem a definição prévia dos micro-organismos envolvidos no agravo de saúde animal e seus perfis de sensibilidade frente às drogas usadas no tratamento.

Infelizmente, estas ações formam um ciclo que culmina na progressiva ineficiência dos antimicrobianos, principalmente porque a utilização inadequada destes exerce uma pressão seletiva sobre as populações de micro-organismos, o que resulta no desenvolvimento de resistência destes agentes patogênicos.

Diante deste fato, o segmento de investigação de novas moléculas com potencial antimicrobiano tem ganhado destaque, tanto para investigação de novos fármacos mais eficazes individualmente, ou que tenham função de recuperação das potencialidades dos antimicrobianos sintéticos, através da realização de associações entre substâncias, visando a descoberta de interações sinérgicas positivas que não apresentem toxicidade ao organismo animal, e tenham viabilidade para a indústria farmacêutica.

As plantas são especialmente ricas em substâncias bioativas devido a sua ampla quimiodiversidade, e o Brasil detém a maior biodiversidade de plantas do mundo. O campo de investigação científica de moléculas bioativas de origem vegetal com potencial antimicrobiano é crescente. Assim, o presente estudo realizará esta investigação com o propósito de obter mais informações da ação antimicrobiana destas biomoléculas, quando da utilização como terapia única e em associação com os antimicrobianos tradicionais, além de verificar o potencial citotóxico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da produção leiteira

No que se referem à produção leiteira no Brasil, dados gerados na última década pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE demonstraram um desenvolvimento harmônico desta atividade com o desenvolvimento econômico do país. Os valores dos níveis de produção obtidos permitiram que o Brasil ocupasse, no ano 2014, a quinta posição no *ranking* mundial da produção leiteira, ficando atrás apenas da União Europeia (ACOSTA *et al.*, 2016).

Entretanto, dados gerados pela Divisão Estatística da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura - FAOSTAT (2013) em relação à mesma atividade, em 2011 – último ano disponível para acesso virtual, os Estados Unidos ocuparam o primeiro lugar de maior produtor mundial de leite, seguido da Índia, China e Brasil. No quarto lugar, a produção brasileira foi responsável por gerar um resultado que demonstrou uma produtividade média satisfatória de 1.381,6 kg/vaca/ano. No Brasil, a pecuária leiteira mostrou possuir um papel econômico de alta significância, além de ser um país com reconhecido potencial de exportação de leite no mercado mundial, também apresenta relevante papel no fornecimento de alimentos e na geração de empregos ao longo de toda a cadeia produtiva leiteira (VIANA; RINALDI, 2010).

Importante salientar que fatores impeditivos de uma ascensão desenvolvimentista da atividade leiteira no território brasileiro ainda constituem a realidade, estando entre estes a diversidade no padrão de produção e a alta prevalência de mastite nos rebanhos leiteiros, esta última será abordada mais adiante no texto. A produção leiteira no Brasil não possui um padrão, sendo realizada tanto por propriedades com produção de subsistência quanto por propriedades com produção de larga escala, onde, do ponto de vista tecnológico, na primeira, as técnicas de produção são subutilizadas ou/e até ausentes, enquanto na segunda, utilizam-se tecnologias avançadas para aperfeiçoar a produção e garantir a obtenção de um produto final controlado (ZOCCAL *et al.*, 2007). Além de ser uma bebida, o leite também é destinado à indústria de laticínios como matéria-prima, assim a qualidade deste produto tornou-se um importante ponto crítico, o qual ainda constitui um dos maiores obstáculos para que ocorra o desenvolvimento e a consolidação da indústria de leiteira e de laticínios no Brasil (GUIMARÃES; LANGONI, 2009).

Na década de 90, a cadeia agroindustrial leiteira passou por profundas e decisivas mudanças no Brasil, as quais foram induzidas por políticas de abertura comercial e também pelo aumento da exigência do mercado consumidor tanto em relação à qualidade, tendo em vista a segurança alimentar, como em relação aos preços e variedades dos produtos (LEITE; GOMES, 2001). Visando o maior controle sanitário do leite padronizaram-se procedimentos com o objetivo de diminuir as perdas relacionadas a alterações no produto final, como a diferença na coloração e a alteração no odor, na maioria das vezes, resultantes da contaminação do produto por micro-organismos e/ou por resíduos de drogas antimicrobianas. Entre os procedimentos operacionais que foram padronizados, as temáticas destes envolveram o acompanhamento rotineiro do estado sanitário do rebanho, o manejo higiênico-sanitário do processo de ordenha, o manejo higiênico-sanitário dos animais, ambientes e equipamentos, as medidas higiênico-sanitárias de funcionários, dentre outros (BRITO; BRITO, 1998; CERQUEIRA; SENA, 1998).

É de amplo conhecimento que os resíduos químicos podem estar presentes no leite, dentre os quais ressaltamos os antimicrobianos, presença esta que abrange diferentes tipos de riscos relacionados à saúde pública, tais como os microbiológicos, os imunopatológicos e os toxicofarmacológicos. Quanto ao primeiro tipo de risco, são responsáveis pela seleção de isolados resistentes (COSTA, 2002), devido à exposição a baixas doses de resíduos antimicrobianos através do consumo do leite, em longo prazo, acarretando em resistência de micro-organismos a antimicrobianos (EMBRAPA, 2004). Quanto ao segundo e terceiro tipos de risco, importância em saúde pública é reconhecida há tempos, sendo apontado o desencadeamento de reações de hipersensibilidade e choque anafilático em indivíduos susceptíveis (DEWDNEY *et al.*, 1991), e quanto ao último risco, este é capaz de afetar o desenvolvimento fetal, resultando em efeito teratogênico em fetos de gestantes que consumiram leites contaminados (COSTA, 1996).

Diante do crescimento de um mercado consumidor com preocupações sobre este tema, e da expansão dos sistemas de produção animal orgânica, novas abordagens terapêuticas não convencionais tornaram-se necessárias para utilização eficaz nas mais diversas patologias e, além disso, uma boa alternativa por serem economicamente viáveis (FONSECA, 2000; ALMEIDA, 2004). Dentre as novas terapias propostas, a fitoterapia vem ganhando amplo destaque desde o início deste século (MITIDIEIRO, 2002).

2.2 Mastite bovina

O termo mastite é derivado do grego “*mastos*” (glândula mamária) e do sufixo “*ite*” (inflamação) (SCHALM, 1971), é o desenvolvimento de um quadro inflamatório nas glândulas mamárias. De acordo com Vlieghe e cols. (2012), por ser uma doença plurietiológica e multifatorial, a mastite é uma das principais enfermidades responsáveis por causar perdas na indústria leiteira. Entre os principais prejuízos ocasionados estão o descarte de vacas por acometimento do parênquima mamário e queda da produção leiteira, a desvalorização comercial das mesmas, a necessidade de diagnóstico microbiológico, medicamentos e profissional médico-veterinário (HASALA *et al.* 2007). Além disso, o descarte do leite de animais em tratamento e a diminuição da qualidade do leite por alterações microbiológicas, físico-químicas, sensoriais condições necessárias para o processamento do mesmo (SANTOS; FONSECA, 2007; LE MARÉCHAL *et al.* 2011b). Quanto aos consumidores, a possibilidade da ingestão de leite proveniente de animais acometidos possibilita que resíduos microbiológicos ou/e antimicrobianos ameacem a saúde dos mesmos (KEFEE, 2012).

Esta enfermidade pode ser desencadeada por traumas físicos, agentes químicos tóxicos e, principalmente, por contaminação da glândula mamária por bactérias patogênicas, assim como outros micro-organismos (BRITO *et al.*, 2001; RADOSTITS *et al.*, 2002). A mastite pode ser classificada em clínica ou subclínica, a depender da forma manifestação da doença. A forma clínica é diagnosticada através da avaliação clínica do animal, que neste caso apresenta sinais clínicos inflamatórios evidentes na glândula mamária, como edema e hipertermia locais, reação de dor ao toque, teto/úbere hipercoreados, dentre outros, sendo possível a ocorrência de febre, anorexia, queda na produção leiteira e até a morte do animal. Além disso, no leite é possível evidenciar a presença de grumos, pus ou mudanças nas características deste (TYLER; CULLOR, 2006; TOZZETTI *et al.*, 2008). Por outro lado, a mastite subclínica não apresenta sinais clínicos inflamatórios evidentes na glândula mamária, entretanto a composição do leite apresenta alterações consideráveis nos seus elementos, tais como o aumento da contagem de células somáticas; aumento dos teores de íons cloro (Cl), sódio (Na), proteínas séricas; diminuição do percentual de sólidos totais, caseína, gordura e lactose, além de ser a forma de manifestação responsável por 70% das perdas de leite resultantes desta enfermidade (SANTOS; FONSECA, 2007). A abordagem diagnóstica da mastite clínica consiste na avaliação clínica de glândula(s)

mamária(s) acometida(s) e realização do teste da caneca de fundo negro ou prova de Tamis, teste de campo utilizado que consiste em um coletor de fundo escuro ou telado, local para onde serão direcionados os primeiros jatos de leite ordenhados. Os achados macroscópicos permitem visualizar as alterações no leite como a presença de grumos, filamentos, coágulos, pus e sangue (VOLTOLINI *et al.*, 2001; SÁ *et al.*, 2004; CARVALHO, 2005). Na mastite subclínica, por sua vez, diagnostica-se tanto de forma direta, através da Contagem de Células Somáticas (CCS), que se baseia na observação e quantificação de leucócitos polimorfonucleares, como de forma indireta, se aplicando a técnica *California Mastitis Test* (CMT) que estima a viscosidade do leite após adição de reagente padrão (ZAFALON *et al.*, 2008; SHARMA *et al.*, 2011; DEB *et al.*, 2013).

Outra forma de classificação refere-se à transmissão dos agentes etiológicos, os quais são separados em dois grupos: contagiosos e ambientais. Patógenos contagiosos são adaptados à sobrevivência no úbere, multiplicam-se sobre ou dentro da glândula mamária, sendo a transmissão de animal para animal ou de uma glândula infectada para outra durante o processo da ordenha. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, e *Mycoplasma species* são os principais agentes etiológicos contagiosos (BRAMLEY; DODD, 1984; SANTOS; FONSECA, 2007). Os agentes ambientais são encontrados no local onde é realizada a criação animal, os quais são encontrados na matéria orgânica (urina, fezes, esterco), sendo a transmissão para as glândulas mamárias entre ou durante o processo de ordenha (OLIVER *et al.*, 2004; FREITAS *et al.*, 2005). As bactérias Gram-positivas das espécies *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*, assim como coliformes e enterococos são considerados os principais patógenos ambientais envolvidos na mastite (HOGAN; SMITH, 2012; KULKARNI; KALIWAL, 2013). Ainda dentro deste grupo, também são encontradas bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*; além de leveduras (COSTA *et al.*, 2012) e fungos (PACHAURI *et al.*, 2013). O quadro ambiental, quando comparado com o contagioso, é caracterizado pela alta incidência de casos clínicos, curta duração e alta frequência de manifestações agudas (SMITH; HOGAN, 2008).

Streptococcus spp. são considerados o segundo grupo em grau de importância na etiologia da mastite em ruminantes, sendo precedido por *Staphylococcus spp.* (INNINGS *et al.*, 2005). As infecções por *Streptococcus sp.* trazem consigo importantes questões em saúde pública, atribuídas tanto ao possível caráter zoonótico como aos fatores de virulência que incluem

proteínas de superfície, polissacarídeos capsulares, exotoxinas, enzimas (hemolisina, fibrinolisin, etc) e o fator CAMP (ChristieAtkins-Munch-Petersen) (KHAN *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2007).

O gênero *Streptococcus* é formado por bactérias pertencentes à família *Streptococcaceae*, Gram-positivas, catalase-negativas e apresentam morfologia de cocos - dispostos aos pares ou em cadeias. São anaeróbios facultativos, visto algumas espécies se multiplicarem mais rapidamente em atmosfera rica dióxido de carbono, em torno de 5 a 10%. O cultivo apresenta bom crescimento em meios de cultura enriquecidos, inclusive por adição de sangue. Bactérias deste gênero podem ser classificadas conforme sua capacidade de lisar células vermelhas sanguíneas, a depender do tipo de hemólise observada nos meios cultura contendo sangue, esses microorganismos são classificados em beta-hemolíticos, alfa-hemolíticos e gama ou não-hemolíticos (CAETANO, 2008). Integrantes da microbiota normal do trato respiratório, gastrointestinal e genital de várias espécies animais, assim como colonizadores transitórios da pele destes. Espécies deste grupo apresentam maior capacidade de sobrevivência e multiplicação em sítios extra mamários, sendo os agentes etiológicos classificados como contagiosos, por exemplo, *S. agalactiae*, e como ambientais as demais espécies (DOUGLAS *et al.*, 2000; DUARTE *et al.*, 2005).

Entre as espécies do gênero, *S. agalactiae* é um dos agentes mais isolados em amostras de leite de bovinos acometidos pelo quadro mastítico (GETANEH *et al.*, 2014; RAMIREZ *et al.*, 2014). Adaptado à sobrevivência no hospedeiro, *S. agalactiae* pode ser encontrado na glândula mamária de animais doentes ou saudáveis, caracterizando-se por ser causador da mastite subclínica com tendência à cronicidade (COSER *et al.*, 2012). O potencial zoonótico deste patógeno vem sendo objetivo de vários estudos. No Brasil, Duarte e cols. (2005) realizaram um estudo comparativo da distribuição de genes específicos de virulência entre isolados de *S. agalactiae* de bovinos e humanos, e os resultados não encontraram similaridade, sugerindo a não ocorrência interespecífica da circulação de distintas populações deste patógeno. Entretanto, estudo semelhante desenvolvido na Nova Zelândia, avaliando a distribuição de sorotipos e genes de resistência em isolados de *S. agalactiae* de bovinos e humanos, demonstrou que 2,4% de isolados de bovinos foram indistinguíveis dos de origem humana, sugerindo uma possível transmissão homem-animal de *S. agalactiae* (DOGAN *et al.*, 2005). O principal fator de virulência encontrado nesta espécie e somente nesta espécie do gênero é o fator CAMP, uma

proteína termoestável que intensifica a lise das hemácias e também possui a capacidade de se ligar a imunoglobulinas G e M (BAKER *et al.*, 1988).

O agente ambiental *Streptococcus uberis* possui grande importância na etiologia de episódios clínicos de mastite bovina em todo o mundo, podendo tender ao quadro subclínica e crônico. A contaminação do animal pelo *S. uberis* ocorre através de fontes ambientais e matéria orgânica, havendo indicações de que o principal veículo sejam as fezes dos bovinos e que a partir deste resíduo orgânico ocasiona-se a contaminação do solo e a disseminação dos micro-organismos pelo ambiente (LOPEZ-BENVAVIDES *et al.*, 2007). Relatos revelaram a existência de uma diversidade extraordinária de isolados de *S. uberis*, assim como, registros tangíveis de isolados capazes de reproduzir infecções clínicas e subclínicas (DOUGLAS *et al.*, 2000; TASSI *et al.*, 2013; HOSSAIN *et al.*, 2015). No Reino Unido, registros da década passada já apontavam esta bactéria como responsável por 33% de todos os casos de mastite clínica e na Dinamarca por 23% (SEGURA; GOTTSCHALK, 2004). Na mesma época foram registrados o isolamento de *S. uberis* envolvendo casos de mastite bovina e bubalina no Brasil (COSTA *et al.*, 2000; SANTOS, 2004). Vários potenciais fatores de virulência foram identificados em *S. uberis*, a lactoferrina e outros, que estariam relacionados em auxiliar o micro-organismo a evitar mecanismos de defesa do hospedeiro e facilitar tanto a adesão às células epiteliais como a colonização do tecido mamário (SEGURA; GOTTSCHALK, 2004). Um desses fatores, uma nova proteína produzida por *S. uberis* e designada SUAM (“*S. uberis* adhesion molecule”), é responsável pela aderência da bactéria às células epiteliais mamárias do animal (OLIVER; GILLESPIE, 2004). A confirmação do isolamento de *S. uberis* de infecções humanas não está documentada.

Tendo em vista o controle da mastite, Massei e cols. (2008) elencaram como essenciais, “o tratamento precoce dos casos clínicos; tratamento de mastite subclínica na interrupção da lactação; descarte de casos crônicos; boas práticas de manejo e higiene no processo de ordenha e monitoramento dos casos clínicos e subclínicos”. De acordo com Sandgren e cols. (2008), a escolha da via de administração deve considerar os esforços para minimizar o uso de antimicrobianos, considerando o diagnóstico da enfermidade. O protocolo terapêutico da mastite bovina deve levar em consideração as peculiaridades apresentadas nas duas formas de apresentação desta doença. Nas infecções subclínicas intramamária – caráter crônico, utiliza-se tratamento por via intramamária, sendo bastante recomendada a inclusão de tratamento parenteral para alcançar melhor resultado (ERKSINE *et al.*, 2002). Já na mastite clínica – caráter agudo, a

recomendação é o tratamento via parenteral, associado ou não ao tratamento intramamário, a fim de evitar o desenvolvimento de bacteremia e septicemia. A intensidade do processo inflamatório determina o aumento da permeabilidade vascular, facilitando a difusão dos antimicrobianos, e também dos micro-organismos. Em muitas situações é aconselhável o uso da terapia combinada, associando antimicrobianos que apresentam sinergismos, onde um potencializa a ação do outro (SILVA, 2003).

A terapia com antimicrobianos é a mais empregada, devido à possibilidade de certificação da eficácia e segurança da ação destas substâncias através de testes, como cultura microbiológica e antibiograma (FERNANDES, 2006). A conduta correta é a indicação de antimicrobianos somente após a realização do teste antibiograma. Entretanto, na maioria das situações não é possível esperar o resultado para a tomada de decisões, sendo iniciado o tratamento de imediato. Os antimicrobianos sintéticos como amoxicilina, gentamicina, oxitetraciclina de longa ação e enrofloxacin são indicados para tratamento sistêmico. Para infusão intramamária (após a ordenha), produtos à base de gentamicina, lincomicina, penicilina associada à novobiocina, cefalotina ou cefoperazona são os mais utilizados (SILVA, 2003).

Tem-se observado o aumento da resistência aos agentes antimicrobianos tradicionais e consequentemente o aumento de falhas terapêuticas e aumento também dos custos com o tratamento. Nesse contexto, produtos naturais tem sido uma importante fonte para a descoberta de novos agentes terapêuticos, o que corrobora que as plantas são especialmente ricas nesses compostos devido a sua ampla quimiodiversidade (IONTA *et al.*, 2015).

2.3 Substâncias bioativas - Tratamento alternativo para a mastite

As plantas medicinais começaram a ser utilizadas pelo homem desde os primórdios, principalmente devido à observação do comportamento de animais, que as utilizam como curativo para as próprias enfermidades (SANTOS *et al.*, 2011). Na história da evolução, a fitoterapia fez-se presente em, praticamente, todas as civilizações. Entre as referências escritas mais antigas, sobre a utilização de plantas como instrumento de cura, está a obra chinesa *Pen Ts'ao* (“A Grande Fitoterapia”), de Shen Nung, de 2800 a.C. (ELDIN; DUNFORD, 2001). Relatos posteriores sobre os egípcios, assírios e hebreus revelam que, desde 2300 a.C., o cultivo

de ervas e a criação de classes de medicamentos era prática comum destes povos. Já na antiga Grécia, uma grande expansão do conhecimento acerca do potencial terapêutico e/ou tóxico das plantas é reportada, junto a isto, a imensurável colaboração de Hipócrates (460-377 a.C.) – o “Pai da Medicina” em sua obra *Corpus Hipocratium*, na qual foram reunidos os conhecimentos médicos de seu tempo para auxiliar na identificação de cada enfermidade e escolha da fitoterapia a ser empregada.

No Brasil, a utilização de plantas no tratamento de doenças teve influência cultural (MARTINS, 1995). Até meados do século XX, a utilização de plantas para a cura de diversas doenças era rotineira, prática esta que foi passada entre gerações. Após o início da industrialização, avanços tecnológicos levaram à maior produção de fármacos sintéticos e aos poucos as pessoas foram atraídas pela promessa de cura rápida e total. No início do século XXI, o cenário brasileiro novamente alterou-se, pois, apesar da maioria da população utilizar drogas sintéticas, notou-se que os fitoterápicos voltaram a conquistar um espaço, cada vez maior, na farmácia caseira (GRAMS, 1999; LORENZI; MATOS, 2002).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde – OMS, considera-se planta medicinal “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2005). A terapia com plantas medicinais ou Fitoterapia, esta última de etimologia derivada do grego *phytos* (vegetal) e *therapeia* (cuidado/terapia), é uma vertente da ciência médica alopática pautada em pesquisas para validação do uso de plantas medicinais na cura de doenças, em íntima relação com a etnobotânica e a etnofarmacologia (SARTI; CARVALHO, 2004; SILVA *et al.*, 2014). A etnobotânica é uma área que estuda e investiga conceitos e conhecimentos que grupos sociais/comunidades/sociedades têm a respeito de componentes do reino vegetal (exemplo: plantas, frutos) (POSEY, 1986), enquanto, a etnofarmacologia consiste na busca científica de agentes biologicamente ativos, tendo por base as terapias vegetais empregadas popularmente (BRUHN, 1989; PRANCE, 1991).

Desta forma, o conhecimento popular tornou-se ferramenta imprescindível para a divulgação de plantas que possuem ação curativa, despertando assim o interesse de pesquisadores de áreas multidisciplinares, a fim de obterem-se mais informações sobre as propriedades químicas destes vegetais para obtenção de produtos fitoterápicos (MACIEL *et al.*, 2002). Para isto, a investigação de constituintes químicos em plantas medicinais, responsáveis pela ação

farmacológica nestes vegetais, redirecionou a condução das pesquisas científicas atuais, que passaram a adotar o fracionamento dos extratos vegetais brutos para o isolamento de princípios ativos. Com a obtenção destes, acredita-se que, gradativamente, haverá a substituição da utilização direta de plantas medicinais, e dos seus extratos brutos, pelas substâncias bioativas com ação farmacológica específica (LEITE, 2009).

Um breve levantamento realizado no ano de 2012, revelou a utilização de plantas medicinais e seus derivados no auxílio do tratamento de doenças em humanos, como alzheimer, cardiopatias, leishmaniose, neoplasias, herpes e artrite (MAHDY *et al.*, 2012; XING *et al.*, 2012; HAZRA *et al.*, 2012; MALHOTRA *et al.*, 2012; ASTANI *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2012), assim como, foram encontrados relatos da eficácia antimicrobiana e anti-inflamatória de fontes de origem vegetal (MULAUDZI *et al.*, 2012; NIU *et al.*, 2012).

Na medicina veterinária, a partir da década de 80, observou-se uma crescente aceitação de terapias de origem vegetal no tratamento de animais, sendo relatado um alto índice de eficácia em tratamentos de parasitoses e enfermidades infecciosas, inclusive tratamentos de mastites, pelos profissionais adeptos da fitoterapia (COSTA *et al.*, 1985). Tendo em vista, a necessidade de garantir a eficiência de protocolos terapêuticos de bacterioses, observou-se um progressivo interesse científico na busca por novas bases em plantas medicinais, potenciais fontes de novas moléculas bioativas (COHEN, 1992; RIBEIRO *et al.*, 2005).

Na década de 90, estudos *in vitro* realizados no Brasil, já relatavam a eficácia antimicrobiana de amostras de própolis de origem brasileira, que mostraram 100% de inibição de isolados de *S. aureus*, 90 % de *S. agalactiae* e 91 % de *E. coli* (LANGONI *et al.*, 1994), sendo a mesma ação eficaz corroborada para bactérias Gram-positivas isoladas de mastite bovina por Vargas e cols. (1994). Experimentos realizados nos Estados Unidos por Baskaram e cols. (2009), e no Brasil por Diaz e cols. (2010), demonstraram *in vitro*, a presença de relevante atividade antibacteriana de óleos essenciais obtidos de plantas da espécie *Cinnamomum verum*, e de extratos de plantas de *Cymbopogon nardus* e *Baccharis dracunculifolia*, respectivamente, contra patógenos envolvidos na mastite bovina. Pozzo e cols. (2011) confirmaram a presença de atividade antimicrobiana de óleos essenciais das plantas condimentares, *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Lippia graveolens* (lipia), *Zingiber officinale* (gingibre), *Salvia officinalis* (sálvia), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Ocimum basilicum* (manjeriço), frente a 32 isolados de *Staphylococcus* spp, oriundos de rebanhos leiteiros bovinos. Em outro

estudo, realizado por Pieri e cols. (2012), foi confirmada atividade antimicrobiana do óleo de copaíba e derivados sobre micro-organismos isolados da placa dental de cães, como o *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp. e *Staphylococcus* sp.

Detentor de 15 a 20% do total de toda a flora, o Brasil é o país com a maior parcela de biodiversidade do mundo, além de representar a maior diversidade genética vegetal do mundo com a catalogação de cerca de 55.000 espécies vegetais. No entanto, apenas 8% tiveram suas substâncias bioativas estudadas e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (BRASIL, 2006). No início do século XXI, o mercado mundial das terapias naturais com plantas medicinais já girava em torno de cerca de 22 bilhões de dólares. Tendência de crescimento prevista para o Brasil, que apesar de apresentar grande riqueza florística com potencial curativo, posicionava-se atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente (YUNES *et al.*, 2001). Nos Estados Unidos, produtos derivados de plantas movimentam cerca de 5 bilhões de dólares, o que no Brasil estima-se não ser diferente, pois cerca de 80% da população utiliza terapias naturais, sendo mais utilizadas as de fonte vegetal (FOGLIO *et al.*, 2006; KAPLAN *et al.*, 2007).

As plantas do grupo de *Garcinia* spp. constituem ricas fontes de compostos bioativos (MONACHE *et al.*, 1984; ALMEIDA *et al.*, 2008). *Garcinia brasiliensis* é uma espécie de árvore nativa da região Amazônica, cultivada em todo o território brasileiro, conhecida popularmente como "bacupari mirim". Na medicina popular, suas folhas são utilizadas para analgesia, úlceras gástricas, doenças urinárias e tumorais, além de artrite (CORRÊA, 1978). A gutiferona-A é uma das substâncias bioativas mais abundantes isoladas de frutos de *G. brasiliensis*, a qual possui diversos relatos sobre as propriedades farmacológicas de seus constituintes na literatura. Dias e cols. (2012) confirmaram a atuação antimicrobiana desta substância ao observar a sensibilidade de *S. aureus* (ATCC 6538) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778) em teste de suscetibilidade. Além desta, atividades anti-HIV, tripanocida, antiplasmódica, antioxidante, antitumoral e inibidora de proteases, também são atribuídas a gutiferona-A (GUSTAFSON *et al.*, 1992; NGOUDELA *et al.*, 2006; COELHO *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2009). A 7-epiclusionona também é uma substância bioativas, derivada da gutiferona-A, que segundo Almeida e cols. (2008) apresenta considerável ação antimicrobiana frente *Streptococcus mutans* (UA158), além de excelente capacidade antiproliferativa de células cancerígenas (MURATA *et al.*, 2009). O potencial antimicrobiano de ambas as substâncias bioativas, também denominadas metabólitos secundários

ou biomoléculas, são pouco conhecidos, havendo a necessidade de mais estudos para que seja possível inferir sobre o espectro de ação, a dosagem, a viabilidade celular mediante o efeito no organismo animal, dentre outros aspectos farmacológicos que envolvem a ação destes princípios.

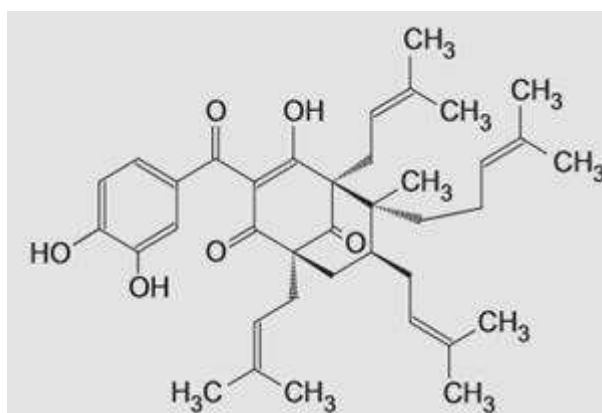


Figura 1. Estrutura química da gutiferona-A. Fonte: PEREIRA *et al.*, 2010.

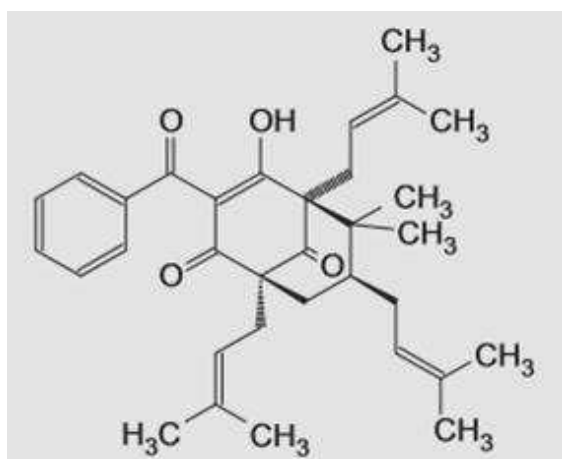


Figura 2. Estrutura química da 7-epiclusianona. Fonte: PEREIRA *et al.*, 2010



Figura 3 – Árvore da espécie *Garcinia brasiliensis*. Fonte: www.arvoresdobrasil.com.br

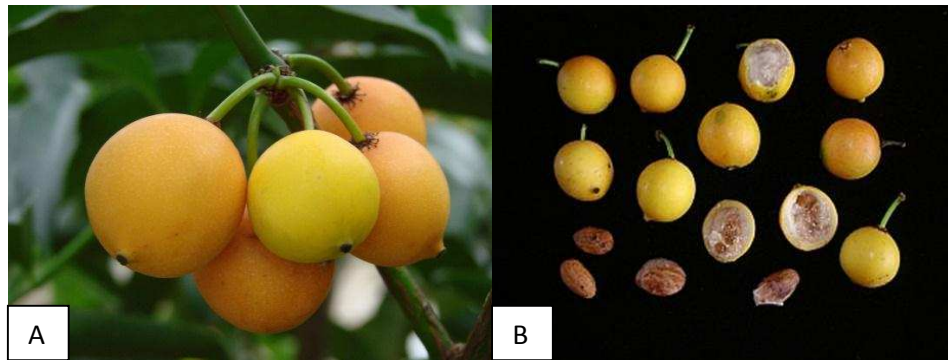


Figura 4 - A e B – Frutos de *Garcinia brasiliensis*. Fonte: www.arvoresdobrasil.com.br

O campo de investigação científica de moléculas bioativas de origem vegetal com potencial antimicrobiano é crescente. Entretanto, a determinação de alvos bacterianos para a utilização de moléculas como princípios ativos ainda é escasso, dificultando a caracterização da ação antimicrobiana e empregabilidade destas substâncias.

Assim, o presente estudo realizará a investigação de novos alvos bacterianos para a gutiferona-A e 7-epiclusianona, com o propósito de obter mais informações da ação antimicrobiana destas biomoléculas, quando da utilização como terapia única e em associação com os antimicrobianos tradicionais, além de verificar o potencial citotóxico em tecido celular específico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antimicrobiano de metabólitos secundários bioativos extraídos dos frutos de *Garcinia brasiliensis* sobre dois isolados de *Streptococcus* spp. causadores de mastite.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das substâncias gutiferona-A e 7-epiclusianona, assim como dos antimicrobianos amoxicilina com clavulanato, ampicilina, ceftriaxona e gentamicina frente a dois isolados bacterianos, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis*;
- Determinar o tipo de interação resultante da associação das substâncias bioativas com antimicrobianos sintéticos, frente aos isolados bacterianos através do teste de sinergismo;
- Avaliar o potencial citotóxico de cada substância bioativa e antimicrobiano sintético selecionado para esta etapa, em cultivo celular de células epiteliais da glândula mamária bovina (MAC-T).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi desenvolvida na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, no Laboratório de Doenças Bacterianas (LDBAC) e Laboratório de Virologia Animal (LVA), ambos localizados no Departamento de Medicina Veterinária (DVT), e no Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia (LIG) - Departamento de Biologia Geral (DBG).

4.1 Isolados bacterianos

As bactérias estudadas foram *Streptococcus uberis* (Su959) e *Streptococcus agalactiae* (Sa4605) obtidas aleatoriamente de amostras da EMBRAPA – Gado de Leite (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Juiz de Fora - MG).

Preparação do Inóculo - A partir de soluções estoque mantidas em freezer - 20°C foram preparadas suspensões de ativação a 1% de bactéria e incubadas por 18 horas (overnight). Destas, 25 µL (microlitros) foram semeados com auxílio de alça de Drigalski em placas de Petri contendo fina camada de Ágar Triptona de Soja – *Tryptic Soy Agar* (TSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), obtendo-se as colônias após 24 horas de incubação. Conforme as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) utilizou-se o Método de Suspensão Direta de Colônias, onde foram transferidas cerca de 3 colônias de cada isolado para tubos de ensaio contendo 3 mL (mililitros) de Caldo Triptona de Soja - *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e, após incubação a 37°C por 2 horas, obtiveram-se suspensões turvas contendo bactérias em fase de crescimento exponencial. Quanto à turbidez, estas suspensões bacterianas foram ajustadas à densidade 0,5 do padrão McFarland (CLSI, 2012), assim como, lidas em espectrofotômetro (*UV-Vis BioMate 3S, Thermo Science*[®]) em comprimento de onda (λ) de 550 nm (nanômetros) obtendo-se a densidade óptica (D.O.) de 0,1 nm correspondente a concentração de $1,0 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL de *Streptococcus* spp. neste experimento. Utilizou-se esta concentração como ponto de partida para o preparo de inoculos, quando da realização de cada etapa da experimentação. Posteriormente, 100 µL da suspensão bacteriana de cada isolado foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de

TSB, alcançando-se a concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, resultando assim na caracterização do inóculo bacteriano.

4.2 Substâncias bioativas

As substâncias bioativas estudadas foram a gutiferona-A (M11) e 7-epiclusianona (M6), fornecidas pelo professor Marcelo Henrique dos Santos, coordenador do Laboratório de Química Orgânica, do Departamento de Química, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Estas substâncias foram obtidas a partir de frutos de *Garcinia brasiliensis*, plantadas e crescidas no herbário da UFV, Minas Gerais, Brasil, sendo o *voucher* de seu exsicata, depositada sob o número VIC2604.

Preparo das substâncias – As soluções de trabalho foram preparadas a partir da adição de 500 μ L de solvente dimetilsulfóxido - DMSO (VETEC[®], Rio de Janeiro, Brasil) a 1 mg de amostra liofilizada de cada substância, e posterior adição de 500 μ L de tampão fosfato-salino - *Phosphate Buffered Saline* (PBS), obtendo-se a padronização da concentração final de 1 mg/mL a 50% de DMSO. A baixa solubilidade de ambas as substâncias mostrou a necessidade da utilização de solvente DMSO e, para isso, realizou-se previamente diluição seriada em microtubos tipo Eppendorff, a fim de observar até qual concentração a solução apresentaria aspecto mais translúcido, correspondente à melhor solubilização das substâncias bioativas.

4.3 Antimicrobianos sintéticos

Foram selecionados antimicrobianos usados no tratamento da mastite bovina, como por exemplos, ampicilina, ceftriaxona e amoxicilina com clavulanato (beta-lactâmicos), e gentamicina (aminoglicosídeos). Da obtenção dos antimicrobianos sintéticos, a ampicilina foi obtida em farmácia de manipulação, e os outros três obtidos em farmácia alopática. A solução de trabalho foi preparada no mesmo dia da utilização, na concentração final de 1 mg/mL, sendo utilizada a quantidade de 1 mL de PBS para diluição destes fármacos.

Todos os antimicrobianos sintéticos e as substâncias bioativas foram testados para ambos os isolados estudados em triplicata e em quatro repetições. Todas as soluções de trabalho foram preparadas no dia do experimento, a fim de evitar possível degradação.

4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM

Adaptando protocolo utilizado por Moreira e cols. (2005) e usando a técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2009/2012), o volume de 500 μL de PBS foi adicionado a 10 microtubos tipo Eppendorff de 1,5 μL , sendo realizada diluição seriada 1:2 com soluções de trabalho de antimicrobianos sintéticos e com substâncias bioativas. Foram adicionados 100 μL da solução diluída de cada antimicrobiano e de cada substância aos poços de microplaca de 96 poços juntamente a 100 μL do inóculo de cada isolado bacteriano, totalizando 200 μL por poço. Com esta nova diluição, o inóculo bacteriano alcançou a concentração final de 10^5 UFC/mL. Assim, os valores das concentrações testadas foram 250; 125; 62,50; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90; 1,95; 0,82 e 0,41 $\mu\text{g/mL}$. Para o controle positivo, utilizou-se 100 μL do inóculo junto a 100 μL de TSB e para o negativo, apenas 200 μL de TSB. Após 24 horas em estufa a 37°C , as microplacas foram lidas em espectrofotômetro. Os resultados de CIM foram obtidos por meio do cálculo da média dos resultados dos testes de microdiluição realizados em duplicata e em quatro repetições. Para análise dos resultados dos testes de suscetibilidade foi adotada a comparação dos valores de CIM com pontos de corte (CLSI, 2014).

4.5 Interações entre antimicrobianos sintéticos e substâncias bioativas

Para a determinação da interação sinérgica, aditiva ou antagônica existente quando da combinação de antimicrobianos sintéticos com as substâncias bioativas foi utilizado o teste de sinergismo aplicando-se o método *Checkerboard* com adaptações (REUK-NGAM *et al.*, 2014). Foram utilizados os antimicrobianos que apresentaram valores de CIM acima ou iguais aos pontos de corte correspondentes à resistência a *Streptococcus spp.*

A partir das soluções de trabalho de antimicrobianos e de substâncias bioativas realizaram-se os reajustes das concentrações das mesmas para 4x; 2x; 1x; 0,5x e 0,25x CIM.

Cada teste foi montado em uma microplaca estéril de 96 poços. Os poços das colunas foram preenchidos com 50 μL da solução antimicrobiana (de cima para baixo) e das linhas com 50 μL da solução da substância bioativa (direita para a esquerda), sendo, além disso, adicionados 100 μL do inóculo bacteriano. Para o controle de cada substância, foram adicionados 50 μL de PBS, 50 μL de solução antimicrobiana ou substância bioativa e 100 μL de inóculo bacteriano em poços localizados na fileira A e na coluna 6. Deste modo, as concentrações finais ficaram na diluição 1:4 (2x; 1x; 0,5x; 0,25x e 0,12 x CIM).

	1	2	3	4	5	6
A	2x	1x	0,50x	0,25x	0,12x	0x / 0y
B	2x+0,12y	1x+0,12y	0,50x+0,12y	0,25x+0,12y	0,12x+0,12y	0,12y
C	2x+0,25y	1x+0,25y	0,50x+0,25y	0,25x+0,25y	0,12x+0,25y	0,25y
D	2x+0,50y	1x+0,50y	0,50x+0,50y	0,25x+0,50y	0,12x+0,50y	0,50y
E	2x+1y	1x+1y	0,50x+1y	0,25x+1y	0,12x+1y	1y
F	2x+2y	1x+2y	0,50x+2y	0,25x+2y	0,12x+2y	2y

X: antimicrobiano sintético; Y: substância bioativa; 0: controle positivo - substância antimicrobiana e substância bioativas ausentes.

Figura 5 – Montagem de teste de sinergismo entre antimicrobianos sintéticos e substâncias bioativas utilizando o método *Checkerboard* com adaptações, demonstrando a combinação bidimensional das diferentes concentrações.

Após a incubação a 37°C por 24 horas, as microplacas foram lidas em espectrofotômetro (D.O.₅₉₅). Os testes de sinergismo foram realizados em triplicatas e os valores de D.O. tiveram suas médias calculadas para confecção de isobologramas (HEWLETT, 1969).

Interpretação dos resultados - Os isobologramas foram construídos para a observação da linha de tendência traçada (Figura 6) a partir dos resultados obtidos nos testes de sinergismos.

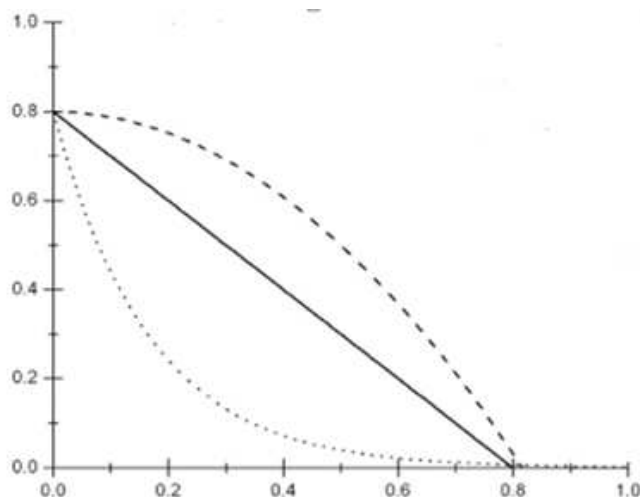


Figura 6 – Isobolograma demonstrando as possíveis linhas de tendência traçadas a partir dos resultados da interação entre duas substâncias. Efeito antagônico: linha tracejada (---); efeito aditivo: linha contínua (-); efeito sinérgico: linha pontilhada (...). Fonte: Biavatti, 2009.

4.6 Teste de citotoxicidade

A citotoxicidade das substâncias bioativas foi avaliada *in vitro* com as células epiteliais da glândula mamária de bovinos (MAC-T) utilizando o método de redução MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolium brometo) segundo Mosmann, 1983.

Preparo de células MAC-T - As células MAC-T foram cultivadas e mantidas em frasco de cultura de 25cm² (Corning Incorporated - Life Sciences, NY, E.U.A) em meio de manutenção constituído de meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco-BRL, Grand Island, NY, E.U.A.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), penicilina (100µg/mL) e estreptomicina (100µg/mL) (HUYNH et al., 1991). Os frascos foram incubados por 37°C em atmosfera umedecida e com 5% de CO₂ e visualizadas diariamente com auxílio de microscópio invertido Olympus IX70 (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japão) para obtenção de monocamada com confluência celular de 90 a 95%.

Após a obtenção da confluência desejada, descartou-se o meio de cultivo e se iniciou o desprendimento das células utilizando o método de tripsinização segundo a rotina do laboratório de Virologia Animal para obtenção do *pellet* de células MAC-T que será usado no teste. A suspensão de trabalho de células foi ajustada à concentração padrão de 2x10⁴ células/mL. Para

isso foram transferidos 20 μL desta suspensão para câmara de Neubauer e, após contagem das células nos quatro quadrantes maiores, calculou-se a média e obteve-se o valor de $157,75 \times 10^4$ células/mL em 10 mL de suspensão. Para obter a concentração de células desejadas foi necessário reajustar o volume da suspensão para 77 mL. Assim, cada 100 μL continha a concentração de 2×10^4 células/mL. Após o preenchimento das microplacas com MAC-T, estas foram incubadas em estufa a 37°C , em atmosfera umedecida e com 5% de CO_2 durante 16 horas (overnight), sendo, ao final disto, observada a formação de monocamada de células no fundo de cada poço, sendo descartado o sobrenadante excedente por inversão.

Montagem do teste - As soluções de antimicrobianos e de substâncias bioativas foram preparadas com base nos valores de CIM obtidos para cada isolado, sendo utilizadas as mesmas concentrações do teste de sinergismo. A figura 8 mostra as concentrações testadas e a disposição destas na microplaca, para a avaliação da citotoxicidade em células epiteliais da glândula mamária de bovinos (MAC-T).

	1	2	3	4
A	2xCIM	2xCIM	2xCIM	2xCIM
B	1xCIM	1xCIM	1xCIM	1xCIM
C	0,5xCIM	0,5xCIM	0,5xCIM	0,5xCIM
D	0,25xCIM	0,25xCIM	0,25xCIM	0,25xCIM
E	0,12xCIM	0,12xCIM	0,12xCIM	0,12xCIM
F	---	---	---	---
G	C-	C-	C-	C-
H	C-	C-	C-	C-

CIM = Concentração Inibitória Mínima; C- = Controle Negativo; ---: poços vazios

Figura 7 – Concentrações testadas de antimicrobianos sintéticos e substâncias bioativas para avaliação da citotoxicidade em células epiteliais da glândula mamária de bovinos (MAC-T).

Todos os poços das linhas A-E foram preenchidos por 100 μL de solução antimicrobiana e por 100 μL de DMEM, totalizando 200 μL por poço. Enquanto, os poços das linhas G e H corresponderam aos controles negativos (C-), os quais foram preenchidos apenas por 100 μL de meio DMEM. Concluída a montagem, as microplacas foram encaminhadas para incubação a

37°C em atmosfera umedecida com 5% de CO₂ durante 72 horas e, posteriormente, realizou-se o ensaio de MTT para avaliação da viabilidade celular.

Ensaio de MTT - Utilizou-se uma adaptação do método colorimétrico de redução do MTT descrito por Mosmann (1983). Este se baseia na capacidade do sal de MTT de entrar na célula e ser reduzido à formazana, seu produto azul escuro não solúvel, em água, o que ocorre somente em células com atividade enzimática mitocondrial. Desta forma, conforme Stockert e cols. (2012), a quantidade de formazana produzida influenciará na leitura dos valores de densidade óptica (D.O.), os quais revelarão proporcionalmente o número de células viáveis.

Após a incubação por 72 horas da microplaca, o sobrenadante foi descartado por inversão e adicionou-se 50 µL de MTT a 1 mg/mL de PBS a cada poço das microplacas, e estas retornaram para condições de incubação anteriores por mais 4 horas. Novamente foram descartados os sobrenadantes e adicionados 100 µL de DMSO nos poços, e as microplacas incubadas novamente com leve agitação por 1 hora a 37 °C para solubilização dos sais de formazana. A leitura da D.O. foi realizada por meio de espectrofotômetro de microplacas a 550_{nm} e, posteriormente, foram analisados os resultados. O teste foi realizado em quadruplicatas em duas placas diferentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Concentração Inibitória Mínima – CIM

Os valores de CIM obtidos foram categorizados quanto à condição de suscetibilidade, através da comparação com pontos de corte de antimicrobianos para *Streptococcus* spp., padronizados pelo CLSI (2014) e EUCAST (2016).

No caso das substâncias bioativas, a gutiferona-A e 7-epiclusianona, apresentaram valores de CIM que variaram de 15,62 a 0,97 µg/mL (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) das substâncias bioativas determinadas para Su959 e Sa4605.

ISOLADOS <i>Streptococcus</i> spp.	Substâncias Bioativas - CIM (µg/mL)	
	M11	M6
Su 959 – <i>Streptococcus uberis</i>	15,62	3,90
Sa4605 – <i>Streptococcus agalactiae</i>	7,81	0,97

M11: gutiferona-A; M6: 7-epiclusianona

Na figura 8, se encontram as médias das leituras das absorbâncias realizadas em triplicatas para a determinação da CIM da gutiferona-A e 7-epiclusianona para cada isolado. Os gráficos referentes a esta figura encontram-se no **anexo 1**.

M11	C+	250 (µg/mL)	125	62,5	31,25	15,625 ¹	7,813 ²	3,906	1,953	0,977	0,488	TSB	
MÉDIA	959	0,648	0,3026	0,165 9	0,0985	0,0758	0,0692 ¹	0,2499	0,2778	0,3585	0,3704	0,3773	0,049
	4605	0,503	0,2803	0,152 5	0,1037	0,078	0,0675	0,0573 ²	0,2306	0,2633	0,2849	0,2488	0,0564
M6	C+	250	125	62,5	31,25	15,625	7,813	3,906 ³	1,953	0,977*	0,488	TSB	
MÉDIA	959	0,742	0,6196	0,419 6	0,2405	0,1104	0,0665	0,0587	0,063 ³	0,1044	0,147	0,1811	0,0543
	4605	0,723	0,4462	0,373	0,2226	0,1021	0,072	0,0618	0,0905	0,0595	0,0593*	0,1637	0,059

M11: gutiferona-A; M6: 7-epiclusianona; C+: poço sem antimicrobiano - apenas bactéria.

Su959: *Streptococcus uberis*; Sa4605: *Streptococcus agalactiae*.

^{1, 2, 3}, *: valores de absorbância referentes a CIM média de cada substância bioativa.

Figura 8 – Valores das absorvâncias médias, obtidas por testes realizados em triplicatas, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da gutiferona-A e 7-epiclusianona para *Streptococcus uberis* (Su959) e *Streptococcus agalactiae* (Sa4605).

A inibição da multiplicação de Su959 e Sa4605 constitui novo e relevante dado sobre a ação antimicrobiana da gutiferona-A e 7-epiclusianona sobre isolados de campo de mastite bovina. Desse modo, demonstra-se a importância destas substâncias para utilização como terapia no controle da mastite causada por estes patógenos. Os valores baixos de CIM corroboraram o grande potencial antibacteriano destas substâncias bioativas, descrito anteriormente para bactérias Gram-positivas ATCC por Almeida e cols. (2008) e Dias e cols. (2012).

Os valores da CIM dos antimicrobianos sintéticos para os isolados Su959 e Sa4605 apresentaram valores variando de 125 a 7,81 µg/mL (Tabela 2). Os dois isolados apresentaram resistência para ampicilina e a gentamicina (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos sintéticos e condição de suscetibilidade de *Streptococcus uberis* (Su959) e *Streptococcus agalactiae* (Sa4605).

Antimicrobianos sintéticos	CIM (µg/mL) e condição de suscetibilidade			
	Su 959		Sa4605	
Ampicilina	125,0	R	31,25	R
Amoxicilina-Clavulanato	---*	S	---1	S
Ceftriaxona	---2	R	---3	S
Gentamicina	31,25	R	7,81	R

Condição de suscetibilidade - S: sensibilidade; R: resistência

--- : determinação da CIM não foi possível

*,^{1,3} não houve multiplicação do isolado bacteriano em nenhuma das concentrações estabelecidas no teste de CIM.

² houve multiplicação do isolado bacteriano em todas as concentrações estabelecidas no teste de CIM.

Na figura 9, encontram as médias das leituras das absorvâncias realizadas em triplicatas para a determinação da CIM dos antimicrobianos sintéticos para cada isolado. Os gráficos referentes a esta figura encontram-se no **anexo 2**.

A	C+	250	125 ¹	62,500	31,25 ²	15,62 ³	7,81*	3,900	1,950	0,970	0,480	TSB	
MÉDIA	959	0,7422	0,0573	0,0633¹	0,3538	0,3669	0,3656	0,4459	0,3671	0,4051	0,4192	0,4334	0,0597
	4605	0,6492	0,0575	0,0575	0,0595	0,057²	0,1355	0,1491	0,1713	0,1496	0,1859	0,2292	0,0641
AC													
MÉDIA	959	1,1691	0,0798	0,0711	0,076	0,0623	0,0605	0,0628	0,0608	0,0585	0,0581	0,1034	0,0478
	4605	0,7533	0,0828	0,0735	0,0639	0,0618	0,0609	0,0642	0,0582	0,0578	0,0573	0,0647	0,0513
C													
MÉDIA	959	0,7751	0,1177	0,2354	0,3077	0,3324	0,3548	0,3859	0,3923	0,4156	0,4706	0,4715	0,042
	4605	0,6334	0,0612	0,0597	0,0586	0,0583	0,058	0,0584	0,0588	0,0582	0,0565	0,0589	0,0532
G													
MÉDIA	959	1,1155	0,0682	0,0688	0,0666	0,06	0,093³	0,8786	0,846	0,8983	0,8891	0,9143	0,05
	4605	0,6523	0,0619	0,062	0,0605	0,0604	0,0612	0,0643*	0,3831	0,3788	0,3707	0,3427	0,0494

A: ampicilina; AC: amoxicilina com clavulanato; C: ceftriaxona; G: gentamicina.

^{1,2,3,*}: absorvância média da Concentração Inibitória Mínima (CIM); ambos marcados pelo mesmo número.

959 ou Su959: *Streptococcus uberis*; 4605 ou Sa4605: *Streptococcus agalactiae*.

C+: valor de absorvância de poços com bactérias com multiplicação na ausência de antimicrobianos.

TSB: *Tryptic Soy Broth* - Caldo Triptona de Soja.

Figura 9 – Valores das médias das absorvâncias realizadas em triplicatas para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos sintéticos para *Streptococcus uberis* e *Streptococcus agalactiae*.

Os valores obtidos de CIM para ampicilina frente Su959 e Sa4605 foram, respectivamente, 125 µg/mL e 31, 25 µg/mL, valores estes acima do ponto de corte padronizado, de 0,25 µg/mL. Desta forma, os isolados de *S. uberis* e *S. agalactiae* testados mostraram alta resistência à ampicilina, condição contrária à relatada recentemente pelo CLSI (2014), e por outros autores, como Erksine e cols. (2000), Rossito e cols. (2002), Pitkala e cols. (2008), além de Loures (2011), que relataram uma alta sensibilidade de *Streptococcus* spp. em relação ao grupo das penicilinas.

A eficaz ação de inibição encontrada nos testes de suscetibilidade, envolvendo amoxicilina e clavulanato, foi condizente com a sensibilidade padronizada ($\leq 0,25$ µg/mL) para o gênero *Streptococcus*, e relatada para *S. uberis* e *S. agalactiae* por Minst e cols., em 2012. A amoxicilina pertence ao grupo de penicilinas semissintéticas e sua associação ao clavulanato tornou-se necessária nos últimos anos devido à resistência bacteriana observada em terapias únicas com amoxicilina (ANDRADE, 2011). A associação aos inibidores de betalactamases, como o clavulanato, tem sido uma das estratégias empregadas quando intenta-se aumentar o potencial antimicrobiano da amoxicilina, impedindo assim a multiplicação de bactérias produtoras de β-lactamases, capazes de bloquear a ação dos fármacos β-lactâmicos (ANDRADE, 2011), resultando na tendência do perfil do teste de suscetibilidade em relação à ampicilina.

Por outro lado, a ceftriaxona não foi capaz de controlar a multiplicação de Su959, apesar da inibição total da multiplicação de Sa 4605. As cefalosporinas de terceira geração são suscetíveis à hidrólise por β -lactamases induzíveis codificadas cromossomicamente, isto é, o simples fato da realização de tratamento com uma cefalosporina de terceira geração pode levar o micro-organismo alvo a produzir β -lactamases, tornando-se resistente à ação deste fármaco. A ação antimicrobiana das cefalosporinas de terceira geração, como a ceftriaxona, é altamente superior em relação às gerações anteriores, sendo conhecidas pela grande capacidade antibacteriana sobre micro-organismos Gram-positivos do gênero *Streptococcus* (ANDRADE, 2011). No Brasil, estudos como o de Maiolini (2013), que asseverou sensibilidade de 81,3% dos isolados de *Streptococcus* spp. à cefoperazona, uma cefalosporina do mesmo grupo da ceftriaxona; e nos EUA, estudo realizado por Erksine e cols. (2002), que revelou através da análise de amostras, do período de 1994 a 2000, que 100% dos isolados de *S. uberis* foram sensíveis ao ceftiofur, confirmam a tendência da condição de sensibilidade destes micro-organismos para cefalosporinas de terceira geração.

Quando comparado ao ponto de corte da gentamicina, o valor obtido de CIM de 15,62 $\mu\text{g/mL}$ para Sa4605 apontou para uma condição de baixa resistência, característica anteriormente citada por estudiosos como Schröder e cols. (2005) e Nam e cols. (2009). No entanto, a CIM obtida para Su959 revelou condição de sensibilidade moderada ou intermediária, fato encontrado também por Kaspar (2006).

Desta forma, os resultados encontrados no presente estudo revelaram que Su959 é resistente aos antimicrobianos ampicilina, gentamicina e ceftriaxona, fato este que não corresponde aos relatados encontrados nos trabalhos de Erksine et al., (2000) e Minst e cols. (2012) os quais revelam sensibilidade de *Streptococcus uberis* isolados de mastite bovina aos antimicrobianos supracitados. O uso excessivo de antimicrobianos na terapia e na prevenção da mastite no lugar onde o isolado foi obtido pode ser um dos fatores para esse fato.

Claramente, observa-se a estruturação de um ciclo de resistência bacteriana, alimentado pela utilização indiscriminada e incorreta de antimicrobianos sintéticos, principalmente para situações preventivas. Os resultados de CIM dos antimicrobianos selecionados revelaram a necessidade da utilização de doses mais elevadas que as doses terapêuticas para que consigam inibir a multiplicação bacteriana, ou a troca da droga terapêutica. Mesmo assim com o passar do tempo, verifica-se um processo de seleção de estirpes cada vez mais resistente. A resistência

bacteriana é um problema de saúde pública também, pois as bactérias podem contaminar os humanos, no caso, pelo leite e derivados, resultando em patologias. Além disso, sabe-se que o mecanismo de transferência de genes de resistência entre as bactérias patogênicas ou não patogênicas, acontece com muita eficiência em diferentes nichos ecológicos (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

A combinação com outros antimicrobianos e/ou a utilização de fármacos alternativos, constituem opções para diminuir este processo de seleção de bactérias resistentes. Assim, para realização do teste de Sinergismo foram utilizados os resultados da CIM como base para a seleção dos antimicrobianos ampicilina e gentamicina, para os quais os isolados Su959 e Sa4605 apresentaram perfis de resistência.

5.2 Teste de Sinergismo

Os resultados obtidos da associação dos antimicrobianos sintéticos com as substâncias bioativas foram analisados a partir das curvas de dispersão contidas nos isobogramas, os quais foram delineados a partir dos resultados pela metodologia de *Checkerboard*.

No total, oito combinações de antimicrobianos foram testados, sendo observado em seis destas interações sinérgicas bem definidas. As figuras 10 a 13 mostram a eficiência das interações entre as substâncias bioativas e os antimicrobianos sintéticos, onde observou-se a inibição da multiplicação do isolado *Streptococcus uberis* (Su959) em todas as situações.

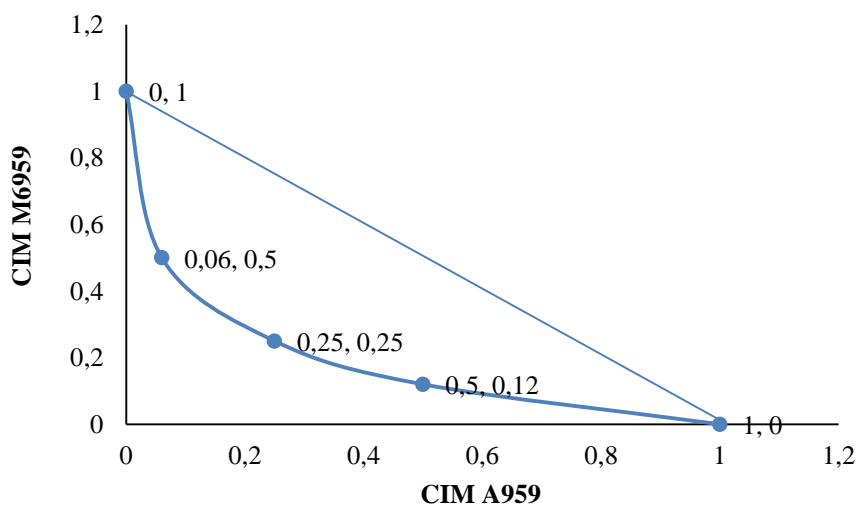


Figura 10 – Isoblograma referente à interação sinérgica entre as frações de CIM M6959 e CIM A959; CIM= Concentração Inibitória Mínima; M6= 7-epiclusianona; A = Ampicilina; 959: *Streptococcus uberis*.

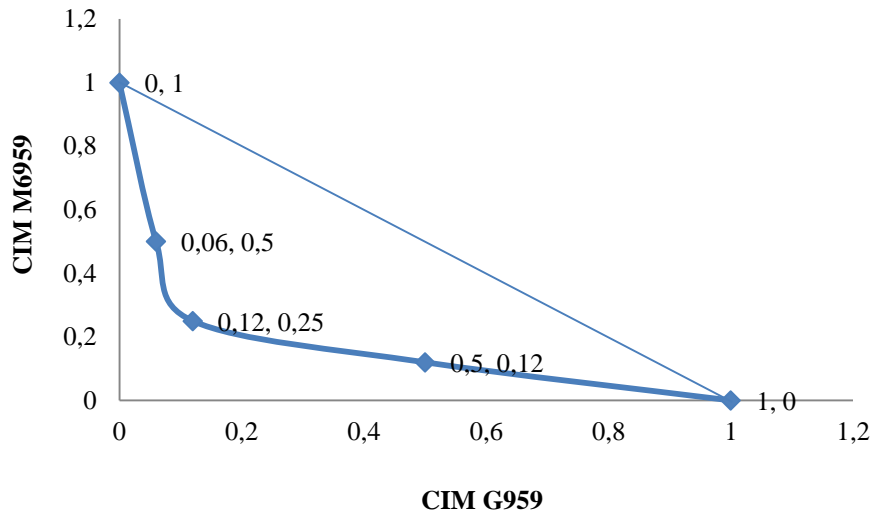


Figura 11 - Isoblograma referente à interação sinérgica entre as frações de CIM M6959 e CIM G959. CIM= Concentração Inibitória Mínima; M6= 7-epiclusianona; G= Gentamicina; 959: *Streptococcus uberis*

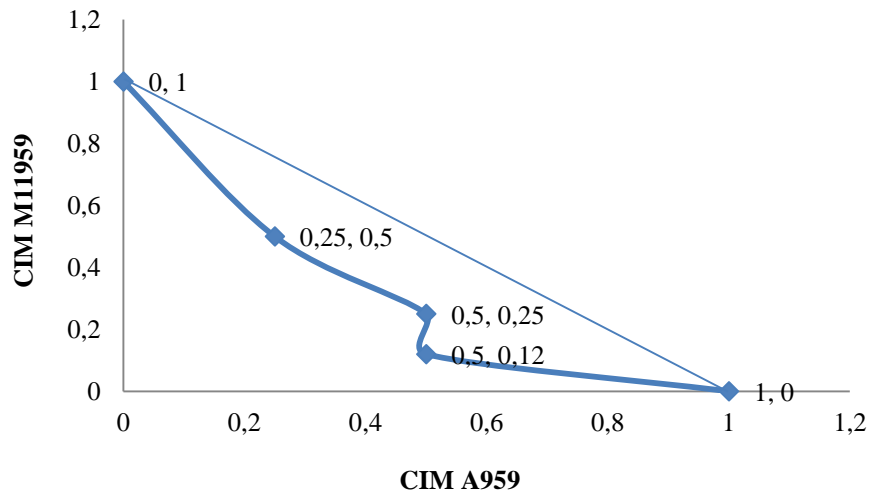


Figura 12 - Isoblograma referente à interação sinérgica entre as frações de CIM M11959 e CIM A959. CIM= Concentração Inibitória Mínima; M11= gutifenora-A; A= Ampicilina; 959: *Streptococcus uberis*

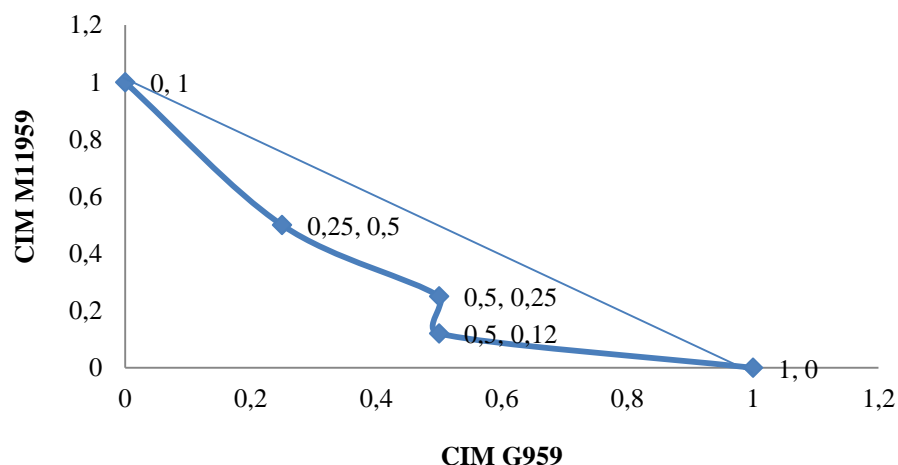


Figura 13 - Isobolograma referente à interação sinérgica entre as frações de CIM M11959 e CIM G959. CIM= Concentração Inibitória Mínima; M6= 7-epiclusianona; G= Gentamicina; 959: *Streptococcus uberis*

Os valores de CIM de Su959 obtidos apontaram para a necessidade da utilização de doses maiores do que as recomendadas pelos fabricantes de antimicrobianos para o controle da multiplicação deste isolado. Porém, após a associação com as substâncias bioativas, houve a potencialização dos efeitos da ampicilina e da gentamicina, sendo observada a eficácia mesmo quando utilizada doses em concentrações abaixo daquelas recomendadas pelo fabricante. Berenbaum (1989), relata em seu trabalho o fato de que a combinação de agentes de diferentes origens realmente difere do efeito encontrado nestes, isoladamente.

As figuras 14 a 17 mostram os resultados das associações das substâncias bioativas com a gentamicina e ampicilina para o isolado *Streptococcus agalactiae* (Sa4605). Foram verificadas interações sinérgicas nas figuras 15 e 17, onde houve a inibição da multiplicação do isolado Sa4605, fato importante pois este isolado apresentou um perfil de resistência a ampicilina e gentamicina, drogas usadas no tratamento da mastite bovina

A figura 14 mostra a que a interação sinérgica entre a ampicilina e a 7-epiclusianona que foi predominante, entretanto no terço final da curva de dispersão houve mudança na tendência desta resposta, sendo visualizado um efeito antagônico. Mais testes deverão ser realizados para elucidar esse comportamento. Na prática, deverá ser usada apenas as concentrações onde houve o sinergismo

Ainda envolvendo a ampicilina, na figura 16, quando em associação com a gutiferona-A, observou-se em um primeiro momento que a tendência da curva de dispersão revelou efeito

aditivo, no entanto esta tendência não se manteve. Conforme ocorreu o aumento das concentrações de ambos os fármacos, verificou-se que a atividade antimicrobiana de ambos decresceu e a interação passou a apresentar caráter antagônico.

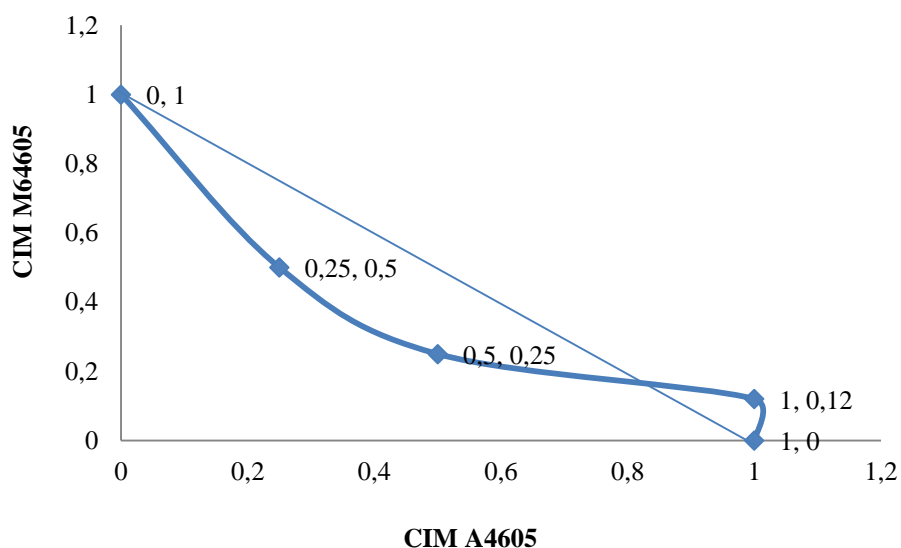


Figura 14 - Isoblograma referente à **interação sinérgica** predominante e tendência final de interação antagônica entre CIM M64605 e CIM A4605. CIM= Concentração Inibitória Mínima; M6= 7-epiclusianona; A= Ampicilina; 4605: *Streptococcus agalactiae*

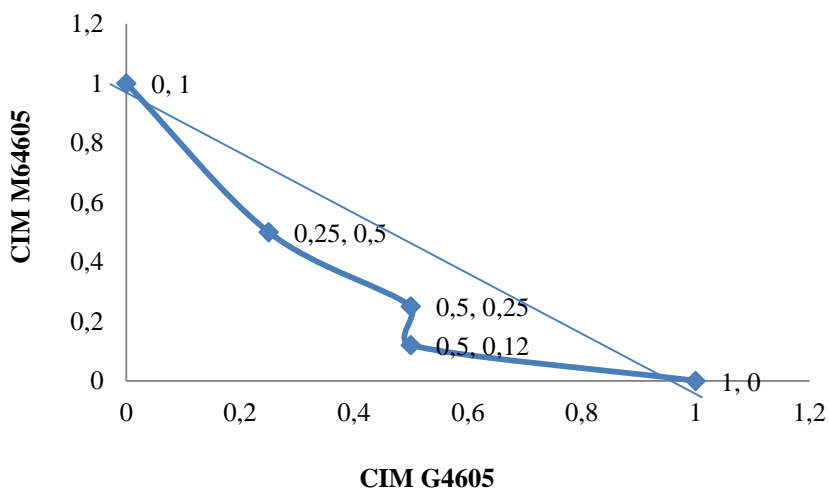


Figura 15 - Isoblograma referente à **interação sinérgica** entre CIM M64605 e CIM G4605. CIM= Concentração Inibitória Mínima; M6= 7-epiclusianona; G= Gentamicina. CIM= Concentração Inibitória Mínima; M6= 7-epiclusianona; G= Gentamicina, 4605: *Streptococcus agalactiae*

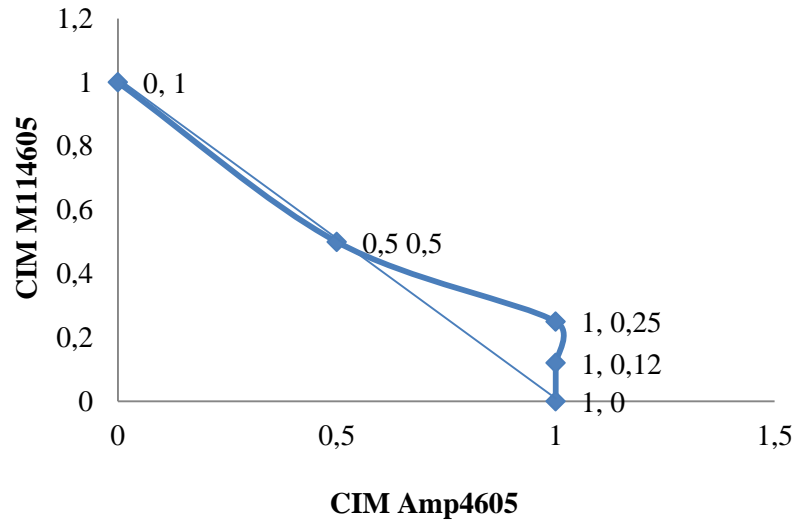


Figura 16 - Isobolograma referente à **interação aditiva** na primeira metade da curva e **interação antagônica** na outra metade, entre CIM M114605 e CIM A4605. CIM= Concentração Inibitória Mínima; M11= Gutiferona-A; G= Gentamicina; 4605: *Streptococcus agalactiae*

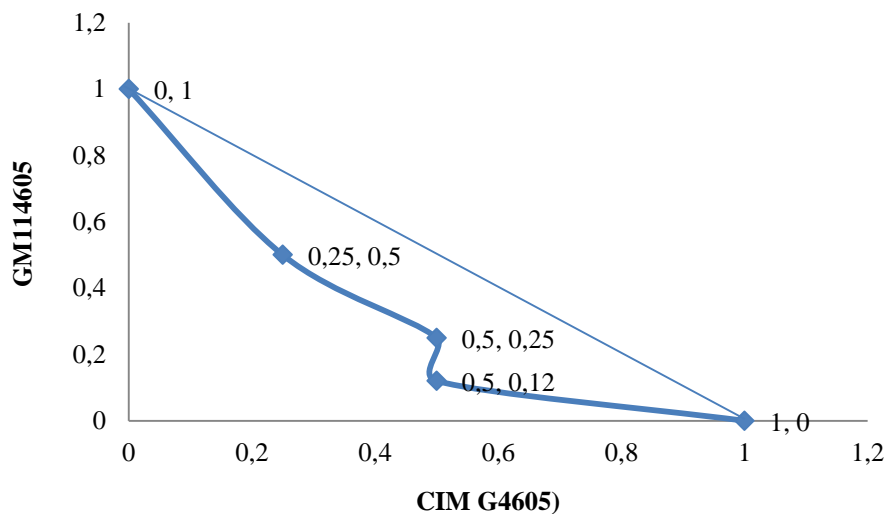


Figura 17 - Isobolograma referente à **interação sinérgica** entre CIM M114605 e CIM G4605. CIM= Concentração Inibitória Mínima; M11= gutiferona-A; G= Gentamicina, 4605: *Streptococcus agalactiae*

Sendo assim, para o isolado Sa4605 pode-se observar que, o efeito antagônico se fez presente conforme ocorreu o aumento das concentrações de ambas as substâncias, o que torna possível afirmar que dependendo da concentração associada, ambos podem interferir no efeito

um do outro. Apesar desta última condição, o efeito adição observado inicialmente, entre a ampicilina e a gutiferona-A, constitui um resultado satisfatório, visto que a ampicilina quando em associação, mesmo em concentrações subinibitórias, exerceu melhor atividade antimicrobiana em relação à quando testada individualmente em sua concentração inibitória padrão.

Esses resultados apontam um caminho de grande êxito no tratamento da mastite bovina, uma vez que o cenário de bactérias resistentes aos antimicrobianos tradicionais é crescente. Assim o uso de associações de drogas de diferentes origens é promissor também na Medicina Veterinária.

5.3 Teste de citotoxicidade

Diante da análise quantitativa dos valores de absorvância obtidos (Figura 18), os resultados revelaram que a gentamicina, ampicilina e 7-epiclusianona (M6) não causaram efeito citotóxico nas células MAC-T em nenhuma das concentrações antimicrobianas determinadas a partir da CIM dos mesmos. Estas três substâncias mostraram-se seguras para utilização de até duas vezes a CIM, sem a ocorrência de alterações da viabilidade das células epiteliais da glândula mamaria – MAC-T.

Por outro lado, a gutiferona-A (M11) revelou seu caráter citotóxico às células MAC-T na concentração de uma vez a CIM (1xCIM), determinado para Su959, e duas vezes a CIM (2xCIM) para Sa4605. Apesar de M11 causar de 23,60% a 56,1% de toxicidade em células MAC-T, estas alterações estão restritas às concentrações maiores que 0,5 x CIM. Tendo em vista que no teste de Sinergismo a fração de CIM utilizada é $\leq 0,5 \times \text{CIM}$, pode utilizar esta substância bioativa em protocolos terapêuticos associadas a antimicrobianos tradicionais.

Abaixo estão demonstradas as densidades ópticas de todos os antimicrobianos testados, valores obtidos a partir do cálculo da média das absorvâncias, em duas repetições e em quadruplicata, de cada concentração (Figura 18).

Antimicrobianos x CIM	Densidade Óptica - D.O. (%)				
	2xCIM	1xCIM	0,5xCIM	0,25xCIM	0,125xCIM
G959	100,85%	98,17%	102,75%	99,58%	100,28%
G4605	102,54%	103,34%	105,68%	100,87	103,74%
A959	102,42%	103,39%	100,17%	100,46%	100,06%
A4605	102,30%	102,59%	100,63%	100,52%	100,29%
M11959	43,09%	76,40%	110,34%	106,77%	106,35%
M114605	59,16%	101,64%	101,99%	101,87%	100,23%
M6959	98,24%	104,21%	101,58%	101,05%	100,64%
M64605	102,80%	102,29%	99,49%	99,71%	99,71%

959 = Su959: *Streptococcus uberis* / 4605 = Sa4605: *Streptococcus agalactiae*
G: Gentamicina / A: Ampicilina / M11: gutiferona-A / M6: 7-epiclusianona

Figura 18 – Valores percentuais de densidade óptica (D.O.), calculados a partir da leitura das absorbâncias dos ensaios de citotoxicidade em cultivo de células epiteliais da glândula mamaria bovina (MAC-T) às concentrações determinadas a partir da Concentração Inibitória Mínima (CIM), para cada antimicrobiano selecionado frente a Su959 e Sa4605.

Os resultados, de forma geral, revelaram que os antimicrobianos sintéticos e as substâncias bioativas usadas não apresentaram efeito citotóxico considerável sobre a célula MAC-T que possa comprometer a utilização destes para a abordagem no tratamento da mastite. Com exceção da gutiferona-A, que apresentou efeito citotóxico nas duas concentrações mais altas.

Tendo em vista, a realização deste estudo para averiguar a possibilidade da utilização das substâncias bioativas como potencializadoras do efeito de antimicrobianos sintéticos ineficazes devido à resistência bacteriana, pode-se dizer que os resultados são promissores e animadores, além de incentivar a sua continuidade.

6. CONCLUSÕES

- As substâncias bioativas gutiferona-A e 7-epiclusianona demonstraram potencial antimicrobiano frente *Streptococcus uberis* e *Streptococcus agalactiae*, isolados de leite de bovinos com mastite.
- As substâncias bioativas recuperaram e potencializaram a ação antimicrobiana de drogas sintéticas usadas no tratamento da mastite bovina quando associadas a estas.
- As substâncias bioativas não apresentaram caráter citotóxico em células epiteliais da glândula mamaria de bovino (MAC-T) em concentrações necessárias para o uso em associações com os antimicrobianos sintéticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, A. C. et al. 2016. Mastites em ruminantes no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, v. 36, n. 7, p. 565-573. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2016000700001>.
- ALMEIDA, L. A. B. 2004. Avaliação do tratamento alopático e homeopático de mastite bovina em animais inoculados com *Staphylococcus aureus*. Dissertação – Universidade de São Paulo, 2004.
- ALMEIDA, L. S. B. et al. 2008. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine*, v. 15, n. 10, p. 886–891, 2008.
- ASTANI, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. 2012. *Melissa officinalis* extract inhibits attachment of herpes simplex virus in vitro. *Chemotherapy*, v. 58, n. 1, p. 70–7.
- BERENBAUM, M. C. 1989. What is synergy? *Pharmacological Reviews*. v. 41, p. 93–141.
- BIAVATTI, M. W. 2009. Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 45, n. 3, p. 371-378.
- BRAMLEY, J; DODD, F.H. 1984. Reviews of the progresso of dairy Science – mastites control – progress and prospects. *J D Res*. 51: 481-512.
- BRASIL, 2006. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2006:60.
- BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. R. 1998. **Qualidade higiênica do leite**. Juiz de Fora – MG.
- BRITO, M. A. V. P. et al. 2001. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 53, p. 531–537.
- CAETANO, M. S. S. G. 2008. Colonização pelo *Streptococcus agalactiae* (EGB) em gestantes atendidas na rede pública de Uberaba-MG. [tese] Minas Gerais: Universidade Federal do Triângulo Mineiro.
- CARVALHO, L.B. 2005. Padrão de infecção intramamária em rebanhos bubalinos na região do Alto São Francisco. 37f. Belo Horizonte, MG. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-graduação da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- CERQUEIRA, M. M. O. P.; SENA, M. J. 1998. Produção higiênica e fatores determinantes da qualidade do leite. *Cienc Vet Trop*, v. 1, p. 115–134.

CLINICAL AND LABORATORIAL STANDARDS INSTITUTE. 2012. **M07-09: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard** — Ninth Edition. [s.l: s.n.]; v. 32.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2012. **M100-S22: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing;** Twenty-Second Informational Supplement. [s.l: s.n.]; v. 32

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2014. **M100-S24: Performance Standards for Antimicrobial Testing Susceptibility,** 2014.

COHEN, M. L. 1992. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science*, Washington, v. 257, n. 11, p. 1050-1055.

COELHO, L. P. et al. 2008. 7-Epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone, relaxes airway smooth muscle through activation of the nitric oxide-cGMP pathway. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 327, n. 1, p. 206–14.

CORREA, M. P.; PENNA, L. DE A. 1974. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas: volume 5.** MR. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal 687p.-illus.. Por Icones. Geog, v. 4, 1974.

COSER, S. M; LOPES, M.A.; COSTA, G.M. 2012. Mastite Bovina: controle e prevenção, boletim técnico, nº 93 - p.1-30.

COSTA, E. O. et al. 1985. Sensibilidade a antimicrobianos e quimioterápicos de bactérias isoladas de mastite bovina. *Pesq Vet Bras*, v. 5, p. 65–69.

COSTA, E. O. 1996. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. *Higiene alimentar*, v. 10, n. 44, p. 15–17.

COSTA, E.O.; WATANABE, E.T.; RIBEIRO, A.R.; GARINO, J.R.; HORIUTI, A.M. & BARUSELLI, P.S. 2000. Mastite bubalina: etiologia, índices de mastite clínica e subclínica. *Napgama*, v.1, p. 12-15.

COSTA, E.O. 2002. Uso de antimicrobianos na mastite. In: Spinosa HS (Org.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 501-515.

DEWDNEY, J.M.; MAES, L.; RAYNAUD, JP.; BLANC, F.; SCHEID, JP.; JACKSON, T.; LENS, S.; VERSCHUEREN, C. 1991. Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential. *Food Chem Toxicol.* 29(7):477-83.

DIAS, K. S. T. et al. 2012. Semisynthesis and antimicrobial activity of novel guttiferone-A derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 8, p. 2713–2720.

DIAZ, M. A. N. et al. 2010. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. v. 20, n. 5, p. 724–728.

DOGAN, B. et al. 2005. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. *Journal of clinical microbiology*, v. 43, n. 12, p. 5899–5906.

DOUGLAS, V.L.; FENWICK, S.G.; PFEIFFER, D.U.; WILLIAMSON, N.B. & HOLMES, C.W. 2000. Genomic typing of *Streptococcus uberis* isolates from cases of mastitis, in New Zealand dairy cows, using pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*. 75: 27-41.

DUARTE, R.S.; BELLEI, B.C.; MIRANDA, O.P.; BRITO, M.A. & TEIXEIRA, L.M. 2005. Distribution and antimicrobial resistance and virulence-related genes among Brazilian group B streptococci recovered from bovine and human sources. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49: 97-103.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária [homepage]. Resistência antimicrobiana x produção animal: uma discussão internacional; 2004 [acesso em 23 jun 2015]. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2000/artigo.2004-12-07.2546062632>.

ERSKINE, R. J. et al. 2002. Trends in Antibacterial Susceptibility of Mastitis Pathogens During a Seven-Year Period. *Journal of Dairy Science*, v. 85, n. 5, p. 1111–1118.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST). **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters** – Version 6.0, valid from 2016-01-01. p. 1–91, 2016. Disponível em: <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf>

FLOGIO, M. A.; QUEROGA, C. L.; SOUZA, I. M. de.; RODRIGUES, R. A. F. 2006. Plantas Medicinais como fonte de recurso terapêutico: Um modelo multidisciplinar. *Revista Multiciência*, Unicamp.

FREITAS, M. F. L. et al. 2005. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus coagulase positivos* isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. *Biológico*, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 171–177.

GETANEH, A.; GIZAT, A.; MESELE, A. 2014. Incidence rate of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in subclinical mastitis at smallholder dairy cattle farms in Hawassa, Ethiopia. *Afr. J. Microbiol. Res*, v.8, p.252-256.

GUIMARAES, F. DE F.; LANGONI, H. 2009. Leite: alimento imprescindível, mas com riscos para a saúde pública. *Veterinária e Zootecnia*, v. 16, n. 1, p. 38–51.

GUSTAFSON, K. R. et al. 1992. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusiarosea*. *Tetrahedron*, v. 48, n. 46, p. 10093–10102.

HAZRA, S. et al. 2012. Antileishmanial activity of cryptolepine analogues and apoptotic effects of 2, 7-dibromocryptolepine against *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasitology research*, v. 111, n. 1, p. 195–203.

HOSSAIN, M.; EGAN, S.A.; COFFEY, T.; WARD, P.N.; WILSON, R.; LEIGH, J.A.; EMES, R.D. 2015. Virulence related sequences; insights provided by comparative genomics of *Streptococcus uberis* of differing virulence. *BMC Genomics*. 16:334.

KEEFE, G.P. 1997. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can. Vet. J*, v.38. p.429-437.

KHAN, I.U.; HASSAN, A.A.; ABDULMAWJOOD, A.; LÄMMLER, C.; WOLTER, W. & ZSCHÖCK, M. 2003. Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. *Journal of Veterinary Science*. v.4, p.213–223.

INNINGS, A.; KRABBE, M.; ULLBERG, M. & HERRMANN, B. 2005. Identification of 43 *Streptococcus* species by pyrosequencing analysis of the rnpB gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 5983-5991.

IONTA, M. et al. 2015. 7-Epiclusianone, a Benzophenone Extracted from *Garcinia brasiliensis* (Clusiaceae), Induces Cell Cycle Arrest in G1/S Transition in A549 Cells. *Molecules*, v. 20, p. 12804–12816.

LEITE, J. P. V. 2009. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, 2009. 328p. ISBN 9788573792379 Número de Chamada: 633.88 F546.

LEITE, J. L. B.; GOMES, A. T. 2001. Perspectivas futuras dos sistemas de produção de leite no Brasil. *O agronegócio do leite no Brasil*. Juiz de Fora: EMBRAPA/CNPGL, p. 207–240.

LI, P.-P. et al. 2012. BAFF/BAFF-R involved in antibodies production of rats with collagen-induced arthritis via PI3K-Akt-mTOR signaling and the regulation of paeoniflorin. *Journal of ethnopharmacology*, v. 141, n. 1, p. 290–300.

LOPEZ-BENAVIDES, M. G. et al. 2007. Field observations on the variation of *Streptococcus uberis* populations in a pasture-based dairy farm. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 90, n. 12, p. 5558-5566.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. 2002. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V. F.; GRZYMBERG, N. F.; ECHEVARIA, A. 2002. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Revista Química Nova*, v. 25, nº 3 – São Paulo.

MAHDY, K. et al. 2012. Effect of some medicinal plant extracts on the oxidative stress status in Alzheimer's disease induced in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, v. 16, n. suppl 3, p. 31–42.

MAIOLINI, 2013 - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SÃO PAULO. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Eficácia “in vitro” e “in vivo” da Cefoperazona Sódica, Gentamicina e Ciprofloxacino no Tratamento Eficácia “in vitro” e “in vivo” da Cefoperazona Sódica, Gentamicina e Ciprofloxacino no Tratamento. 2013.

MARTINS, F. T. et al. 2009. Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. *European journal of medicinal chemistry*, v. 44, n. 3, p. 1230–1239.

MITIDIERO, A. M. A. 2002. Potencial do uso de homeopatia e fitoterapia como opção na bovinocultura leiteira: avaliação dos aspectos sanitários e de produção. p. 132.

MONACHE, G. D. et al. 1984. Minor xanthenes from *Rheedia gardneriana*. *Phytochemistry*, v. 23, n. 8, p. 1757–1759.

MOREIRA, M. R. et al. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT - Food Science and Technology*, v. 38, n. 5, p. 565–570.

NGOUELA, S. et al. 2006. Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f. *Phytochemistry*, v. 67, n. 3, p. 302–306.

PIERI, F. A. et al. 2012. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. *Brazilian dental journal*, v. 23, n. 1, p. 36-38.

PITKÄLÄ, A.; KOORT, J.; BJÖRKROTH, J. 2008. Identification and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine milk samples. *Journal of dairy science*, v. 91, n. 10, p. 4075–4081.

POSEY, D. A. 1986. In: Ribeiro, B. G. **Suma Etnológica Brasileira-1**. Etnobiologia; Editora Vozes: Petrópolis, p. 302.; PRANCE, G.T. 1991. *J. Ethnopharmacol.*, 32, 209.; BRUHN, J. G. 1989; *Acta Pharm. Nord.*, 1, 117.

POZZO, Dal et al. 2012. Antibacterial Activity of Essential Oil of Cinnamon and Trans-cinnamaldehyde against *Staphylococcus* spp. Isolated from Clinical Mastitis of Cattle and Goats. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 40, n. 4, p. 1–5.

RAMÍREZ, N.F.; KEEFE, G.; DOHOO, I.; SÁNCHEZ, J.; ARROYAVE, O.; CERÓN, J.; JARAMILLO, M. & PALACIO L. 2014. Herd-and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. *J. Dairy Sci.* 97:4141-4150.

RADOSTITS, O. M. et al. 2002. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. [s.l.] Editora: Guanabara Koogan, São Paulo.

REUK-NGAM, N. et al. 2014. Antimicrobial activity of coronarin D and its synergistic potential with antibiotics. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1–8.

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J. P. V.; DANTAS-BARROS, A. M. 2005. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba, v. 15, n. 1, p. 65-70, 2005.

ROSSITTO, P. V et al. 2002. Antibiotic Susceptibility Patterns for Environmental Streptococci Isolated from Bovine Mastitis in Central California Dairies. *J. Dairy Sci.*, v. 85, p. 132–138.

SÁ, M. E. P. et al. 2004. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 41, n.5, p.320-326.

SARTI, S.J.; CARVALHO, J.C.T. 2004. In: CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos Anti-Inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Fitoterapia e fitoterápicos. Ribeirão Preto: Tecmedd. 13-38 p.

SEGURA, M.; GOTTSCHALK, M. 2004. Extracellular virulence factors of streptococci associated with animal diseases. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, v. 9, p. 1157–1188.

SCHALM, O. W.; CARROLL, E. J.; JAIN, N. C. 1971. Bovine Mastitis, Lea and Febiger. Philadelphia, Pa.

SMITH, K. L.; HOGAN, J. 2008. **Environmental mastitis: Know your opponent**. Proc. Regional Meeting of the National Mastitis Council. **Anais...**2008.

TASSI, R; MCNEILLY, T.N.; FITZPATRICK, J.L., FONTAINE, M.C., REDDICK, D., RAMAGE, C., LUTTON, M.; SCHUKKEN, Y.H., ZADOKS, R.N. 2013. Strain- specific pathogenicity of putative host- adapted and nonadapted strains of *Streptococcus uberis* in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 96:5129–5145.

TYLER, J. W.; CULLOR, J. S. Sanidade e distúrbios da glândula mamária. SMITH, B.P. 2006. **In: Tratado de medicina interna de grandes animais**. São Paulo: Manole, p. 1019–1038.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. 2005. Medicinal plants: safe cure? *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 519–528.

VIANA, G; RINALDI, R. N. 2011. Principais fatores que influenciam o desempenho da cadeia produtiva de leite – um estudo com os produtores de leite do município de Laranjeiras do Sul-PR. *Organizações Rurais & Agroindustriais*, v. 12, n. 2.

VLIEGHER, S.; FOX, L.K.; PIEPERS, S.; MCDOUGALL, S. & BARKEMA, H.W. 2012. Invited review: Mastitis in dairy heifers - Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J. Dairy Sci.* 95: 1025-1040.

VOLTOLINI, T. V. et al. 2001. Influência dos estádios de lactação sobre a contagem de células somáticas do leite de vacas da raça holandesa e identificação de patógenos causadores de mastite no rebanho. *Acta Scientiarum*, v. 23, n. 4, p. 961- 966, 2001.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. 2001. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, v.24, n. 1, p.147-152.

XING, Y. et al. 2012. The effects of allitridi and amiodarone on the conduction system and reverse use-dependence in the isolated hearts of rats with myocardial infarction. *Journal of ethnopharmacology*, v. 141, n. 2, p. 674–684.

ZAFALON, L. F. et al. 2008. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. *Veterinária e Zootecnia*, v.15, n.1, p.56-65.

ZOCCAL, R.; VASCONCELOS, A.; JUNQUEIRA, R. Z. M. 2008. A nova pecuária leiteira. II Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite; Recife, Brasil: PROGENE, DZ-UFRPE; 2008.

ANEXO I

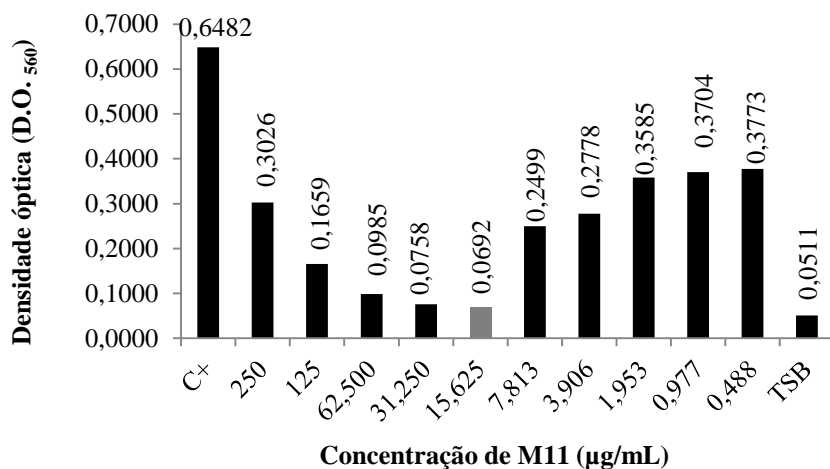


Figura A' - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da gutiferona-A (M11) para *Streptococcus uberis* (Su959). A CIM média de M11 para este isolado está representada pela coluna cinza na figura acima. D.O. 560 = leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 560 nanômetros.

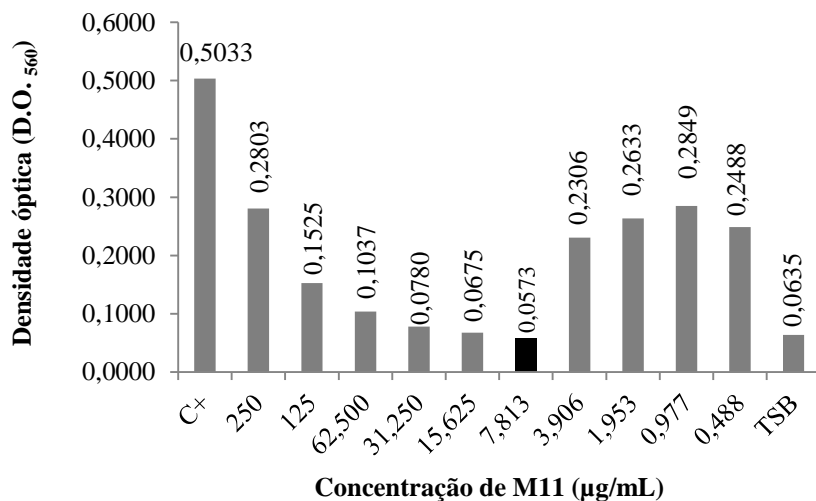


Figura A'' - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da gutiferona-A (M11) para *Streptococcus agalactiae* (Sa4605). A CIM média de M11 está representada pela coluna preta na figura acima. D.O. 560 = leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 560 nanômetros.

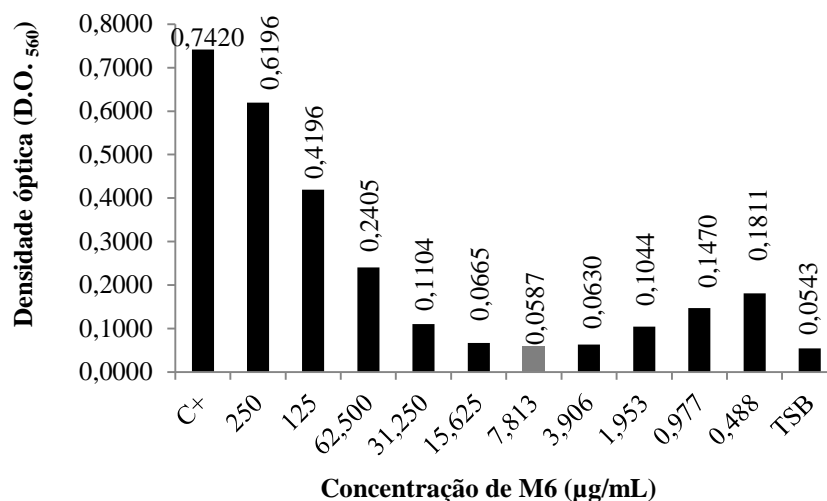


Figura B' - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da 7-epiclusianona (M6) para *Streptococcus uberis* (Su959). A CIM média de M6 para este isolado está indicada na coluna com coloração cinza. D.O. 560 = leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 560 nanômetros.

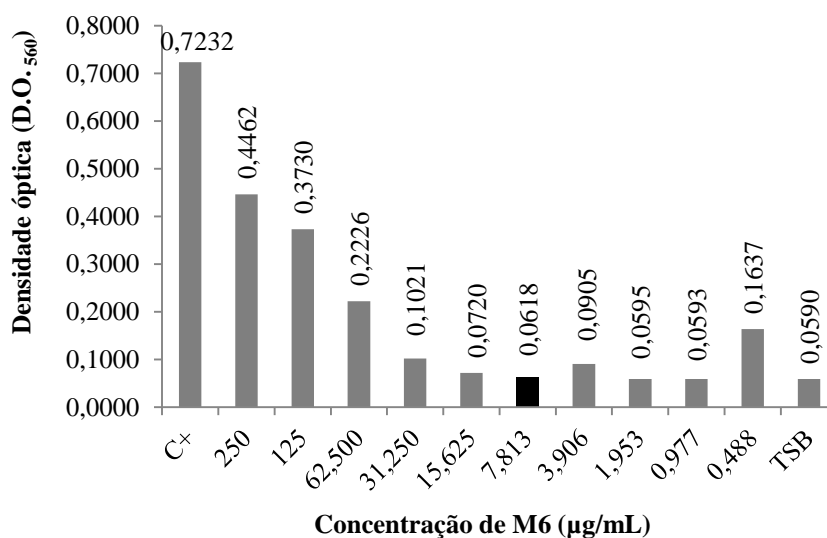


Figura B'' - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da 7-epiclusianona (M6) para *Streptococcus agalactiae* (Sa4605). A CIM média de M6 para este isolado está representada na área do gráfico em coluna de coloração preta. D.O. 560 = leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 560 nanômetros.

ANEXO II

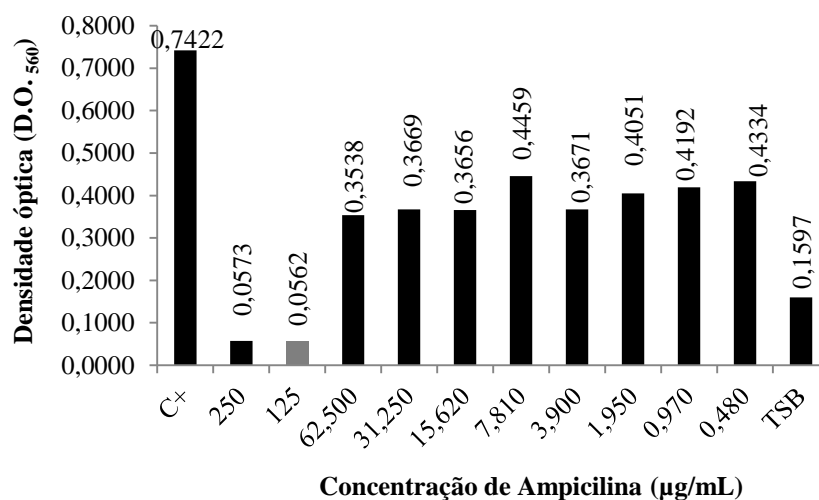


Figura A - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da ampicilina para *Streptococcus uberis* (Su959). A CIM média de ampicilina para este isolado está representada na coluna de coloração cinza. D.O. ₅₆₀ = leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 560 nanômetros.

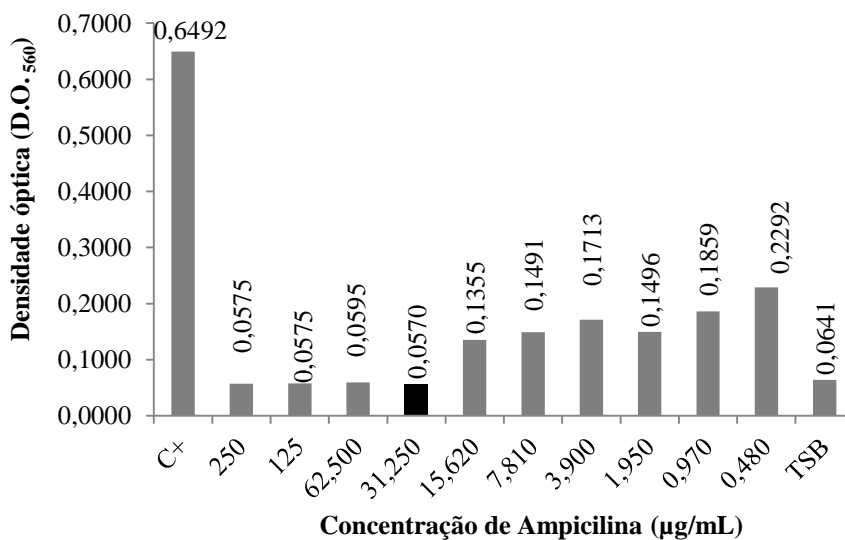


Figura A* - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da ampicilina para *Streptococcus agalactiae* (Sa4605). A CIM média de ampicilina para este isolado está representada na coluna de coloração preta. D.O. ₅₆₀ = leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 560 nanômetros.

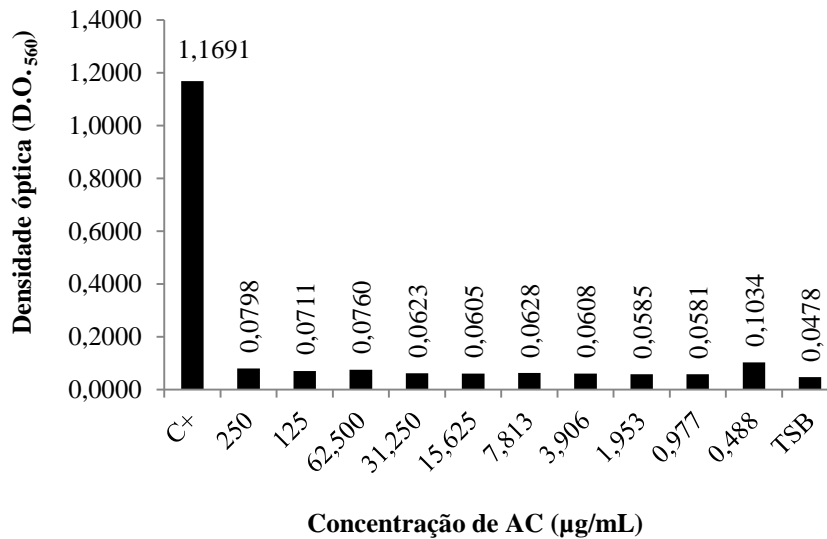


Figura B - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de amoxicilina com clavulanato para *Streptococcus uberis* (Su959). A CIM média de amoxicilina com clavulanato não foi determinada para este isolado. AC = Amoxicilina com clavulanato; D.O. 560 = leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 560 nanômetros.

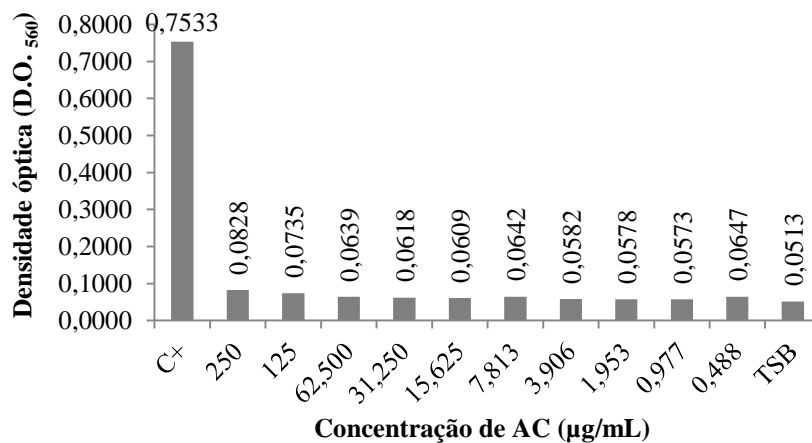


Figura B* - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) amoxicilina com clavulanato para *Streptococcus agalactiae* (Sa4605). A CIM média de amoxicilina com clavulanato não foi determinada para este isolado. AC = Amoxicilina com clavulanato; D.O. 560 = leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 560 nanômetros.

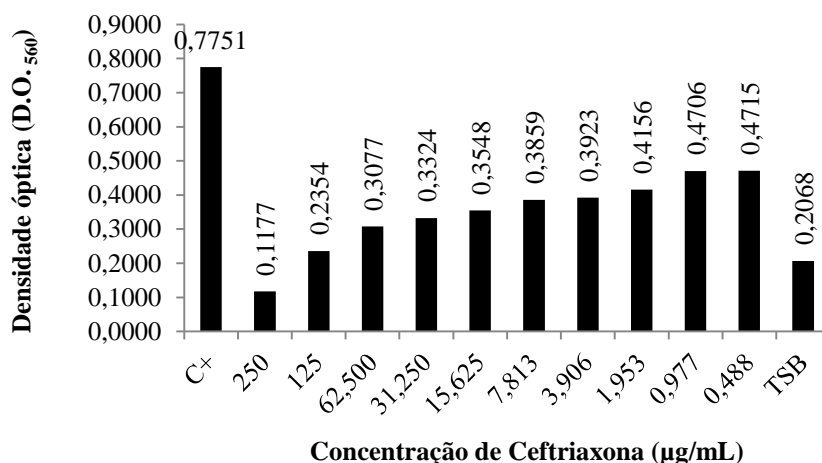


Figura C - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de ceftriaxona para *Streptococcus uberis* (Su959). A CIM média de ceftriaxona não foi determinada para este isolado. D.O. 560 = leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 560 nanômetros.

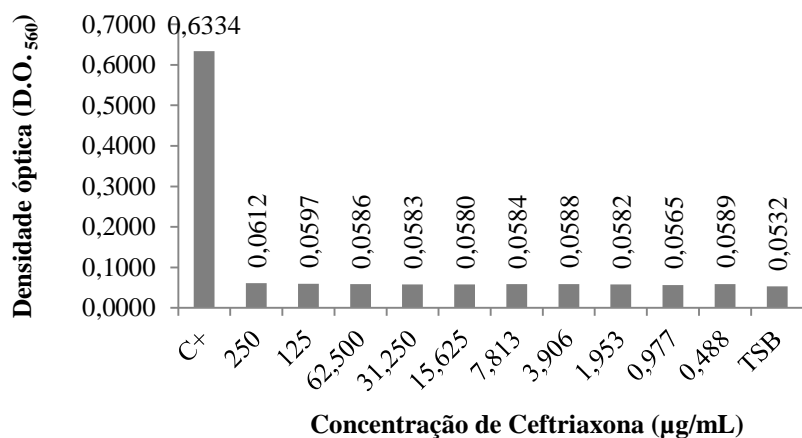


Figura C* - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de ceftriaxona para *Streptococcus agalactiae* (Sa4605). A CIM média de ceftriaxona não foi determinada para este isolado. D.O. 560 = leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 560 nanômetros.

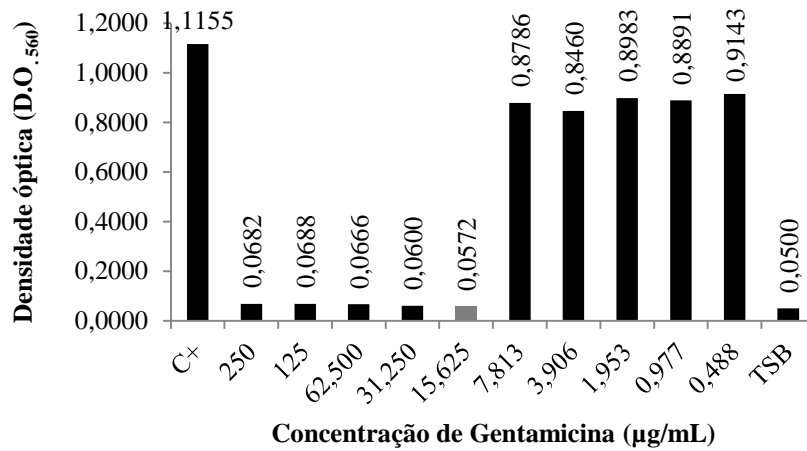


Figura D - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de gentamicina para *Streptococcus uberis* (Su959). A CIM média de gentamicina para este isolado está representada na coluna de coloração cinza. D.O. 560 = leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 560 nanômetros.

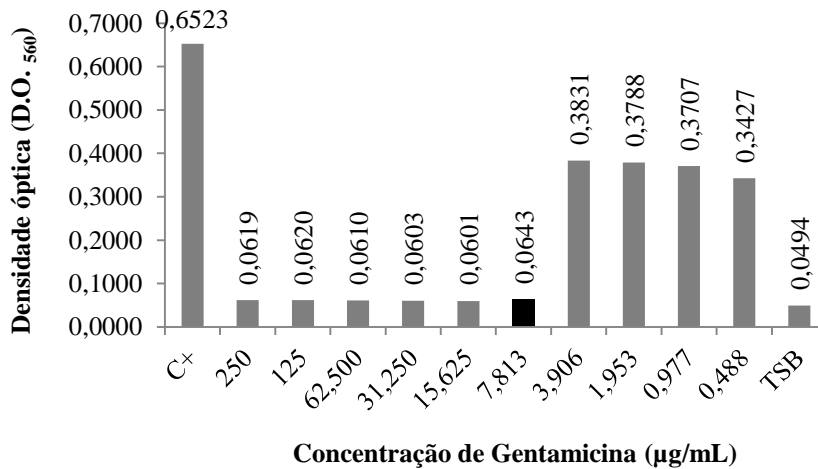


Figura D* - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de gentamicina para *Streptococcus agalactiae* (Sa4605). A CIM média de gentamicina para este isolado está representada na coluna de coloração preta. D.O. 560 = leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 560 nanômetros.